

Université de Sherbrooke

Étude des interactions cellule-matrice dans l'ancrage des cellules
souches intestinales humaines

Par

Joëlle Auclair

Département d'anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)

Septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-17267-4
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-17267-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
RÉSUMÉ.....	XI
I - INTRODUCTION	1
1. L'intestin grêle humain.....	1
1.1. Anatomie et histologie fonctionnelle.....	1
1.2. Dynamique de l'épithélium intestinal.....	2
1.3. Organisation de la crypte	3
1.4. Morphogenèse de l'intestin grêle	5
1.5. Régulateurs du développement intestinal.....	6
1.5.1. Glucocorticoïdes.....	6
1.5.2. Facteur de croissance épidermique	8
2. Niches des cellules souches	12
2.1. Facteurs sécrétés.....	12
2.2. Interactions cellule-cellule	14
2.3. Interactions cellule-matrice	16
3. Interactions épithélio-mésenchymateuses via la matrice extracellulaire dans le contexte de l'axe crypte-villosité	17
3.1. Membrane basilaire	18
3.2. Laminines.....	19

3.2.1. Structure et isoformes.....	19
3.2.2. Laminines dans le contexte de l'axe crypte-villosité.....	20
3.2.3. Laminines: morphogenèse, prolifération, adhésion et survie cellulaire	21
3.3. Récepteurs des laminines	23
3.3.1. Intégrines.....	23
3.3.1.1. Intégrine $\alpha1\beta1$	25
3.3.1.2. Intégrine $\alpha2\beta1$	27
3.3.2. Dystroglycan	29
4. Problématique et objectifs du projet de recherche.....	35
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	37
1. Tissus fœtaux et adultes	37
2. Culture <i>in vitro</i> :	37
2.1. Culture cellulaire : HIEC-6 (Human Intestinal Epithelial Cells).....	37
2.2. Culture organotypique.....	38
3. Immunofluorescence Indirecte	39
3.1. Préparation des échantillons	39
3.2. Procédure d'immunofluorescence indirecte	39
3.2.1. Immunodétection simple.....	39
3.2.2. Immunodétection double	40
4. Immunobuvardage Western	43
4.1. Extraction protéique	43

4.2. Migration des protéines sur gel SDS-PAGE	44
4.3. Transfert des protéines sur membrane et détection de la protéine d'intérêt	44
4.4. Densitométrie des bandes immunoréactives	46
5. Extraction d'ARNs totaux	48
5.1. Cellules et extraction d'ARNs	48
5.2. Tissus et extraction d'ARNs.....	49
5.3. Réaction de transcription inverse: production d'ADNc	50
5.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	50
5.5. RT-PCR quantitatif (PCR en temps réel)	51
6. Test d'adhésion cellulaire	54
6.1. Préparation des plaques.....	54
6.2. Récupération et ensemencement des cellules.....	55
6.3. Quantification de l'adhésion cellulaire	57
7. Tests statistiques.....	58
III - RÉSULTATS.....	59
1. Analyse des intégrines cryptales associées aux interactions cellules- laminines dans la muqueuse intestinale humaine	59
1.1. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans la muqueuse intestinale	59
1.2. La sous-unité $\alpha 2$ des intégrines est présente dans l'épithélium intestinal	63

2. Effet de régulateurs du développement intestinal, glucocorticoïdes et EGF, sur l'expression des intégrines et la morphologie cellulaire.....	66
2.1. Modulation de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines en culture organotypique	66
2.2. Variations quantitatives des intégrines cryptales dans les cellules HIEC-6	67
2.3. Observation de différences morphologiques pour les cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF	69
3. Modification du potentiel adhésif des cellules HIEC-6 en présence d'EGF et/ou de glucocorticoïdes.....	74
3.1. Adhésion court terme des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF sur les laminines-1/2.....	74
3.2. Adhésion long terme des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF sur les laminines-1/2.....	75
3.3. Identification des intégrines justifiant l'adhésion sur laminine-1 des cellules HIEC-6 traitées à l'EGF.....	79
3.4. Détermination des intégrines permettant l'adhésion sur laminine-1 des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes.....	80
3.5. Définition du mode adhésif sur laminine-2 des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes.....	81
4. Caractérisation dans la muqueuse intestinale humaine de l'expression du dystroglycan, un récepteur cellulaire pour les laminines	86

4.1. Expression du dystroglycan dans les tissus foëtaux et l'intestin grêle adulte ainsi que dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain	86
4.2. Localisation des sous-unités α et β du dystroglycan dans l'intestin grêle	90
4.3. Co-localisation dystroglycan/laminine dans l'intestin grêle adulte ..	94
5. Expression du dystroglycan est associée à un type cellulaire spécifique....	96
6. Analyse d'une adhésion fonctionnelle via le dystroglycan pour les cellules HIEC-6	98
IV - DISCUSSION	100
1. Le dystroglycan est présent dans l'épithélium intestinal humain et constitue un récepteur potentiel pour les laminines.....	100
2. La distribution du dystroglycan au tiers inférieur des cryptes suggère une implication au sein de la niche des cellules souches intestinales humaines.	105
2.1. Le dystroglycan est un système d'ancrage potentiel pour les cellules du compartiment souche intestinal humain.	106
2.2. Le dystroglycan et le contrôle de la survie des cellules souches intestinales humaines.	107
3. Les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ sont des récepteurs associés au compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal humain	108
4. Les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ pourraient participer à la formation des cryptes intestinales humaines	110

5. Les régulateurs morphogéniques de l'intestin modulent l'expression des intégrines cryptales $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$	112
5.1. Régulation négative de la sous-unité $\alpha 1$ par EGF et le déclin des récepteurs EGF.....	114
5.2 Sensibilité des spécimens aux glucocorticoïdes	115
5.3. <i>In vivo</i> , implication possible des glucocorticoïdes dans la première phase du développement foetal de l'intestin grêle humain.	116
5.4. Glucocorticoïdes et morphologie cellulaire	118
6. L'adhésion différentielle sur les laminines pour les cellules HIEC-6 exposées aux glucocorticoïdes et à l'EGF.....	118
6.1. Adhésion différentielle et glucocorticoïdes: mécanismes intrinsèques	121
7. Adhésion et survie cellulaire	123
8. Rôle potentiel des récepteurs de type laminine dans l'établissement de la niche des cellules souches intestinales humaines : modèle hypothétique. ...	124
V - CONCLUSION	126
REMERCIEMENT	127
BIBLIOGRAPHIE.....	128

LISTE DES ILLUSTRATIONS

I-INTRODUCTION

Figure 1. L'axe crypte-villosité et les modèles cellulaires.....	9
Figure 2. L'organisation hiérarchique de la crypte intestinale.....	10
Figure 3. Morphogenèse de la muqueuse intestinale humaine.....	11
Figure 4. Distribution des laminines dans l'axe crypte-villosité au cours du développement de l'intestin grêle humain.....	32
Figure 5. Distribution des intégrines récepteurs de laminines dans l'intestin grêle adulte.....	33
Figure 6. Le dystroglycan	34

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 1. Anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte.....	42
Tableau 2. Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western.....	47
Tableau 3. Séquences d'amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR et RT-PCR quantitatif.....	53
Tableau 4. Matrices utilisées pour les tests d'adhésion cellulaire.....	54
Tableau 5. Anticorps neutralisants et agent pharmacologique utilisés pour les tests d'inhibition d'adhésion cellulaire.....	56

III-RÉSULTATS

Figure 7. Expression et localisation de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines au cours de la morphogenèse de l'intestin grêle humain.....	61
Figure 8. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans l'intestin grêle fœtal et les lignées cellulaires intestinales humaines.....	62
Figure 9. Localisation et expression de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines au cours de la morphogenèse de l'intestin grêle humain ainsi que dans les tissus fœtaux et les lignées cellulaires intestinales.....	65
Figure 10. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines en culture organotypique.....	70
Figure 11. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression protéique des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$ des intégrines dans les cellules HIEC-6.....	71
Figure 12. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression de l'ARNm des sous-unités α et β des intégrines dans les cellules HIEC-6.....	72
Figure 13. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur la morphologie des cellules HIEC-6.....	73
Figure 14. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur le potentiel adhésif à court terme des cellules HIEC-6.....	77
Figure 15. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur le potentiel adhésif à long terme des cellules HIEC-6.....	78
Figure 16. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à l'EGF, sur la laminine-1, est intégrine $\beta 1$ dépendante via les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 6$	83
Figure 17. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à aux glucocorticoïdes, sur la laminine-1, s'effectue majoritairement par les intégrines de type $\beta 1$ via les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$	84
Figure 18. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à aux glucocorticoïdes, sur la laminine-2, s'effectue par une contribution mineure des intégrines de type $\beta 1$	85
Figure 19. Expression du dystroglycan dans les tissus fœtaux et l'intestin grêle adulte humain.....	88

Figure 20. Expression du dystroglycan dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain.....	89
Figure 21. Expression et distribution de la sous-unité β du dystroglycan dans la muqueuse intestinale humaine au cours du développement.....	92
Figure 22. Expression et distribution de la sous-unité α du dystroglycan dans la muqueuse intestinale humaine au cours du développement.....	93
Figure 23. Co-distribution du dystroglycan et des chaînes $\gamma 1\beta 1$ des laminines dans la muqueuse de l'intestin grêle adulte.....	95
Figure 24. Expression type cellulaire spécifique du dystroglycan dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte.....	97
Figure 25. Adhésion fonctionnelle du dystroglycan dans le modèle cellulaire HIEC-6.....	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire

ALP : phosphatase alcaline

ARNm : ARN messenger

BSA : Albumine sérique bovine

DAPI : 4,6-Diamidino-2-phénylindole

DEPC : Diethyl Pyrocarbonate

dNTPS : Déoxynucléotides triphosphates (N = A,T,C,G)

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EGFh : Facteur de croissance épidermique humain

FBS : Sérum bovin foetal

HEPES : 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate

HIEC : Human Intestinal Epithelial Cell

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pb : Paires de bases

RT : Transcriptase inverse

SDS : Sodium dodécyl sulfate

TAE : Tris-acetate EDTA

TBS : Tampon Tris salin

RÉSUMÉ

Étude des interactions cellule-matrice dans l'ancrage des cellules souches intestinales humaines

Joelle Auclair

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

Dans l'intestin grêle, l'épithélium se renouvelle grâce à la présence d'une population souche localisée au fond des cryptes. Cependant, les mécanismes d'ancrage associés à l'établissement et au maintien de ce compartiment spécialisé sont encore inconnus. La distribution péricryptale de la laminine-2 exclusivement à ce site, au stade adulte, pourrait contribuer à cette mobilisation cellulaire. Par conséquent, les interactions laminine-dépendante nécessite la participation d'un répertoire spécifique de récepteurs dont plusieurs intégrines et le dystroglycan, un récepteur initialement identifié dans le muscle strié.

Dans cette étude, les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ ainsi que le dystroglycan ont été analysés dans la muqueuse intestinale humaine et les modèles cellulaires épithéliaux. Les résultats obtenus par immunofluorescence indirecte, immunobuvardage de type western et RT-PCR, ont permis de démontrer leur présence dans le compartiment épithélial prolifératif au cours du développement foetal. Chez l'adulte, la sous-unité $\alpha1$ des intégrines et le dystroglycan ont été retrouvés en co-distribution avec la laminine-2. In vitro, les trois récepteurs étaient exprimés par les cellules intestinales humaines indifférenciées HIEC-6. Dans un second temps, ces cellules ont été utilisées afin d'évaluer l'impact des régulateurs du développement intestinal (EGF et glucocorticoïdes), sur la mise en place d'un système d'ancrage intégrine dépendant. Les analyses ont révélé une modulation différentielle de l'expression des sous-unités $\alpha1$ et $\alpha2$. De même, le potentiel adhésif des cellules HIEC-6 a également été altéré par ces facteurs de croissance. Les traitements aux glucocorticoïdes ont permis, entre autres, de mettre en évidence des mécanismes d'ancrage distincts pour les laminines 1 et 2.

Ces résultats démontrent que l'interaction de ces récepteurs avec la laminine-2, pourrait être impliqué dans la formation d'un compartiment cellulaire souche sous l'influence de régulateurs du développement tels que l'EGF et les glucocorticoïdes.

I - INTRODUCTION

1. L'intestin grêle humain

1.1. Anatomie et histologie fonctionnelle

Au sein du système digestif, l'intestin grêle est un organe indispensable à la progression de la digestion ainsi qu'à l'absorption des nutriments. Ces fonctions sont accomplies avec une efficacité étonnante grâce à la complexité de la muqueuse intestinale. Cette complexité se définit, dans un premier temps, par la subdivision de l'intestin grêle dans l'axe proximo-distal en 3 segments (duodénum, jéjunum et iléon) procurant ainsi une certaine hiérarchie fonctionnelle. D'autre part, l'aspect morphologique de la muqueuse constitue un second élément déterminant. En effet, cette dernière présente, à sa face luminale, un grand nombre de replis profonds et de projections digitiformes, les villosités, qui permettent d'augmenter de façon importante la surface disponible pour l'entrée des nutriments. De même, l'acquisition de spécialisations membranaires telles que les microvillosités, par les entérocytes matures, contribue également au rendement exceptionnel du tractus digestif.

1.2. Dynamique de l'épithélium intestinal

L'épithélium de l'intestin grêle est composé d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par un système de jonctions intercellulaires et une interaction avec la matrice extracellulaire. Cet épithélium unique est caractérisé par un renouvellement cellulaire constant qui s'opère à l'intérieur d'une unité fonctionnelle distincte, l'axe crypte-villosité (Figure 1) (Leblond, 1981). Ce modèle hautement dynamique permet l'étude de plusieurs processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire. Les propriétés morphologiques et fonctionnelles des cellules épithéliales permettent de diviser cet axe en deux segments spécifiques. En effet, le compartiment cryptal (glande de Lieberkühn) se compose principalement de cellules prolifératives indifférenciées et en voie de différenciation ainsi que d'une population cellulaire mature, les cellules de Paneth (Potten et Loeffler, 1990), tandis que la portion villositaire est constituée de cellules pleinement différenciées et actives tels que les cellules absorbantes, à mucus et entéro-endocrines (Leblond, 1981; Babyatsky et Podolsky, 1999).

L'épithélium intestinal se renouvelle à tous les 3 à 5 jours grâce à la présence de cellules souches localisées au fond des cryptes (Klein et McKenzie, 1983). Par division mitotique, ces cellules pluripotentes donnent naissance à des cellules filles (Cheng et Leblond, 1974). Ces dernières prolifèrent et amorcent leur programme de différenciation au cours du processus migratoire dans le

compartiment cryptal. Dès leur détermination, les cellules absorbantes, à mucus et entéro-endocrines s'engagent dans une migration ascendante qui les mènera au compartiment villositaire tandis que les cellules de Paneth se dirigent à la base des cryptes (Karam, 1999). Dans la villosité, les cellules poursuivent leur migration le long de cet axe et aboutissent à l'apex où se termine le cycle, par une élimination apoptotique (Renehan et al., 2001).

1.3. Organisation de la crypte

Le compartiment cryptal obéit à une hiérarchie cellulaire très stricte (Figure 2). Cette distribution ordonnée permet de répondre aux contraintes du renouvellement cellulaire. Ainsi, les glandes de Lieberkühn regroupent différentes populations cellulaires: les cellules de Paneth, les cellules souches et les cellules prolifératives en voie de différenciation.

Principales composantes matures de l'unité cryptale, les cellules de Paneth résident au fond de cette structure glandulaire, intercalées entre les cellules souches. Les cellules de Paneth semble être impliquées dans la cytoprotection par la sécrétion de molécules bioactives telles que les défensines (Porter et al., 1997; Ouellette, 1997; Ganz, 2000), le lysozyme (Erlandsen et al., 1974; Porter et al., 2002; Salzman et al. 2003) et la phospholipase A2 groupe II (Nevalainen et al., 2001) qui sont reconnus pour leurs effets antimicrobiens.

Pour leur part, les cellules souches se localisent également dans le tiers inférieur des cryptes et peuvent être subdivisées en quatre classes distinctes (Potten, 1998). Chacune de ces classes a été identifiées expérimentalement par des essais de survie aux irradiations (Withers et Elkind, 1970; Potten, 1977; Roberts et al., 1994). Ce modèle suggère qu'il y a entre 4-6 cellules souches fonctionnelles par crypte à l'état normal. Par contre, en présence d'agents génotoxiques (irradiations), ces cellules optent pour l'activation d'une voie apoptotique p53-dépendante plutôt que d'une voie menant à la réparation de l'ADN (Merritt et al., 1994; Potten, 2004). Lorsque les cellules souches disparaissent, elles peuvent être remplacées par leurs cellules filles immédiates qui possèdent une plus grande résistance. Ces cellules en transit sont dites clonogéniques puisqu'elles ont conservé un potentiel de régénération permettant de reconstituer et de maintenir la population cryptale. De même, les deux autres générations cellulaires, subséquentes aux cellules filles immédiates, retiennent également ce potentiel clonogénique. Ce système hiérarchique permet donc d'estimer la population souche/clonogénique entre 30-40 cellules (Marshman et al., 2002). Enfin, après trois générations de cellules clonogéniques, les cellules en transit acquièrent leur détermination et perdent donc leur capacité de régénération cryptale (Booth et Potten, 2000).

1.4. Morphogenèse de l'intestin grêle

Dans l'intestin grêle humain, l'architecture et les fonctions tissulaires sont acquises très tôt dans le développement foetal (Figure 3). À la 8^e semaine de gestation, la paroi tubulaire consiste en un épithélium stratifié reposant sur un tissu mésenchymateux (Verma, 1979; Lacroix et al., 1984). L'abondance de figures mitotiques à chacune des strates témoignent des capacités de prolifération des cellules épithéliales (Moxey et Trier, 1978). Le remodelage de la muqueuse et la formation de villosités débutent dès la 9^e semaine, dans les régions proximales de l'intestin grêle (Montgomery et al., 1999). Ces projections sont alors tapissées d'un épithélium cylindrique simple tandis que les espaces intervillositaires ont conservé une apparence stratifiée (Moxey et Trier, 1978). L'invagination des cellules épithéliales dans le mésenchyme s'effectue vers la 14^e semaine de vie foetale et permet le développement de cryptes primitives. À partir de ce stade, la zone proliférative se retrouve confinée dans une structure glandulaire (Arsenault et Ménard, 1987). Ainsi, à la mi-gestation (18-20 semaines), la morphologie de la muqueuse de l'intestin grêle foetal est semblable à celle d'un tissu adulte avec une axe crypte-villosité bien développée et des capacités digestives comparables (Ménard et Beaulieu, 1994).

1.5. Régulateurs du développement intestinal

Depuis plusieurs décennies, une reconnaissance est octroyée aux hormones ainsi qu'aux facteurs de croissance pour leur implication dans la régulation du développement fonctionnel de l'intestin grêle (Moog, 1979; Simon et al., 1982; Kedinger et al., 1986; Babyatsky et Podolsky, 1999; Montgomery et al., 1999). Parmi ces candidats, les glucocorticoïdes et le facteur de croissance épidermique (EGF) sont les modulateurs morphogéniques les plus étudiés du système gastro-intestinal (Simon-Assmann et al., 1982; Beaulieu et al., 1985; Arsenault et Ménard, 1985; Quaroni, 1985; Conteas et al., 1986; Beaulieu et Calvert, 1984, 1987; Ménard et al., 1988)

1.5.1. Glucocorticoïdes

L'activité promotrice des glucocorticoïdes sur le développement fœtal humain est principalement associée au cortisol. La présence de cette hormone dans le compartiment fœtal provient en partie d'une diffusion transplacentale du cortisol maternel. Toutefois, la majorité de ce cortisol est métabolisé en cortisone par le placenta lors du transfert (Murphy, 1981). Cette conversion semble être une caractéristique physiologique importante de l'activité des glucocorticoïdes puisque la cortisone est considérée comme étant une hormone inactive (Murphy, 1979). Néanmoins, le cortisol maternel résiduel alimente significativement le compartiment fœtal (Davies, 1980). En plus d'une contribution maternelle, les glandes surrénales du fœtus produisent du cortisol

dès la 8^e semaine de gestation (Murphy, 1979; Murphy et Diez d'Aux, 1972). Cette production endogène constitue une source importante de glucocorticoïdes qui est également régulée par l'activité oxydative du placenta (Murphy, 1981).

Au cours du développement fœtal, les niveaux de glucocorticoïdes sont soumis à une régulation très stricte. Au premier trimestre, les taux circulants de cortisol sont relativement faibles. À partir de la 18^e semaine, le ratio cortisol/cortisone augmente graduellement dans le liquide amniotique grâce au potentiel réducteur du chorion et de certains organes fœtaux qui permettent la conversion de la cortisone en cortisol (Murphy, 1979; 1981). Entre les 35^e et 40^e semaines, la concentration de cortisol double pour atteindre sa valeur maximale (Murphy, 1979). Cette forte augmentation, en fin de grossesse, contribue à la maturation de certaines enzymes digestives de l'intestin grêle. En effet, des expériences en culture organotypique ont démontrées que des concentrations élevées de glucocorticoïdes augmentaient significativement l'activité de la lactase et de la phosphatase alcaline, des enzymes de la bordure en brosse (Arsenault et Ménard, 1985; Simon-Assmann et al., 1986). De plus, cette hormone augmenterait également la prolifération cellulaire dans les épithéliums d'explants intestinaux humains (Arsenault et Ménard, 1985). Ainsi, les glucocorticoïdes participent directement au développement fonctionnel du tractus digestif.

1.5.2. Facteur de croissance épidermique

La présence du facteur de croissance épidermique (EGF) dans plusieurs fluides corporels (salive, sérum, liquide amniotique et lait maternel) évoque une implication dans le développement embryonnaire ainsi que dans la morphogenèse et le maintien fonctionnel du tractus digestif (Chailier et Ménard, 1999). Dans l'intestin grêle fœtal humain, la distribution épithéliale du récepteur EGF est principalement confinée à la zone proliférative (Ménard et Pothier, 1991). L'expression de ce récepteur est maximale entre la 12^e et la 14^e semaine de vie fœtale et diminue drastiquement dans les semaines suivantes (Pothier et Ménard, 1988). Les effets biologiques de l'EGF diffèrent de ceux observés pour les glucocorticoïdes. En culture organotypique, la présence d'EGF, à certaines concentrations, induit une diminution significative de la synthèse d'ADN et de l'activité enzymatique de plusieurs dissacharidases dans l'intestin grêle fœtal (Ménard et al. 1988). En plus d'affecter la prolifération cellulaire et l'activité enzymatique, ce facteur de croissance est également impliqué dans la synthèse et le renouvellement de la matrice extracellulaire (Hata et al., 1984; Panneerselvam et al., 1985).

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

L'axe crypte-villosité constitue l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle. Dans cet épithélium hautement dynamique, les cellules prolifératives, descendantes des cellules souches localisées à la base des cryptes, se différencient au cours du processus migratoire dans le compartiment cryptal (c). Par la suite, elles progressent dans le compartiment villositaire (v) jusqu'à l'apex où elles sont éliminées par apoptose.

Certains modèles cellulaires épithéliaux permettent de récapituler l'axe crypte-villosité. Les HIEC-6 forment une lignée épithéliale normale représentative de la population de cellules prolifératives et indifférenciées des cryptes intestinales humaines. La lignée Caco-2/15, malgré son origine carcinomateuse (côlon), permet l'analyse des mécanismes associés à la différenciation cellulaire.

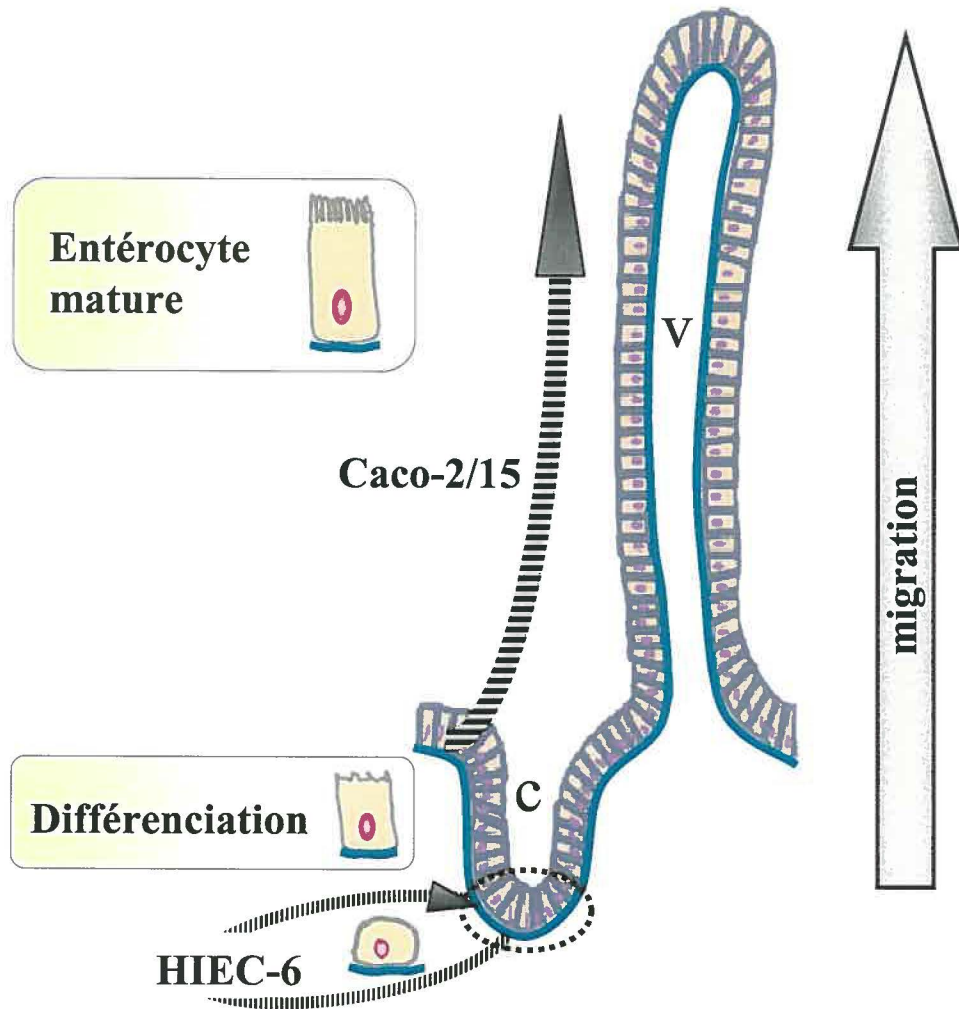


Figure 2. Organisation hiérarchique de la crypte intestinale

Les cellules souches primordiales résident au fond des cryptes. Elles génèrent les cellules souches clonogéniques qui maintiennent un potentiel souche pendant trois générations (SC1-SC3). La détermination cellulaire, à la génération suivante (cellules en transition T1), coïncide avec la perte de cette capacité de régénération cryptale. Après deux autres divisions, (T2 et T3), les cellules amorcent leur programme de différenciation terminale pour atteindre une pleine maturité à la base du compartiment villositaire.

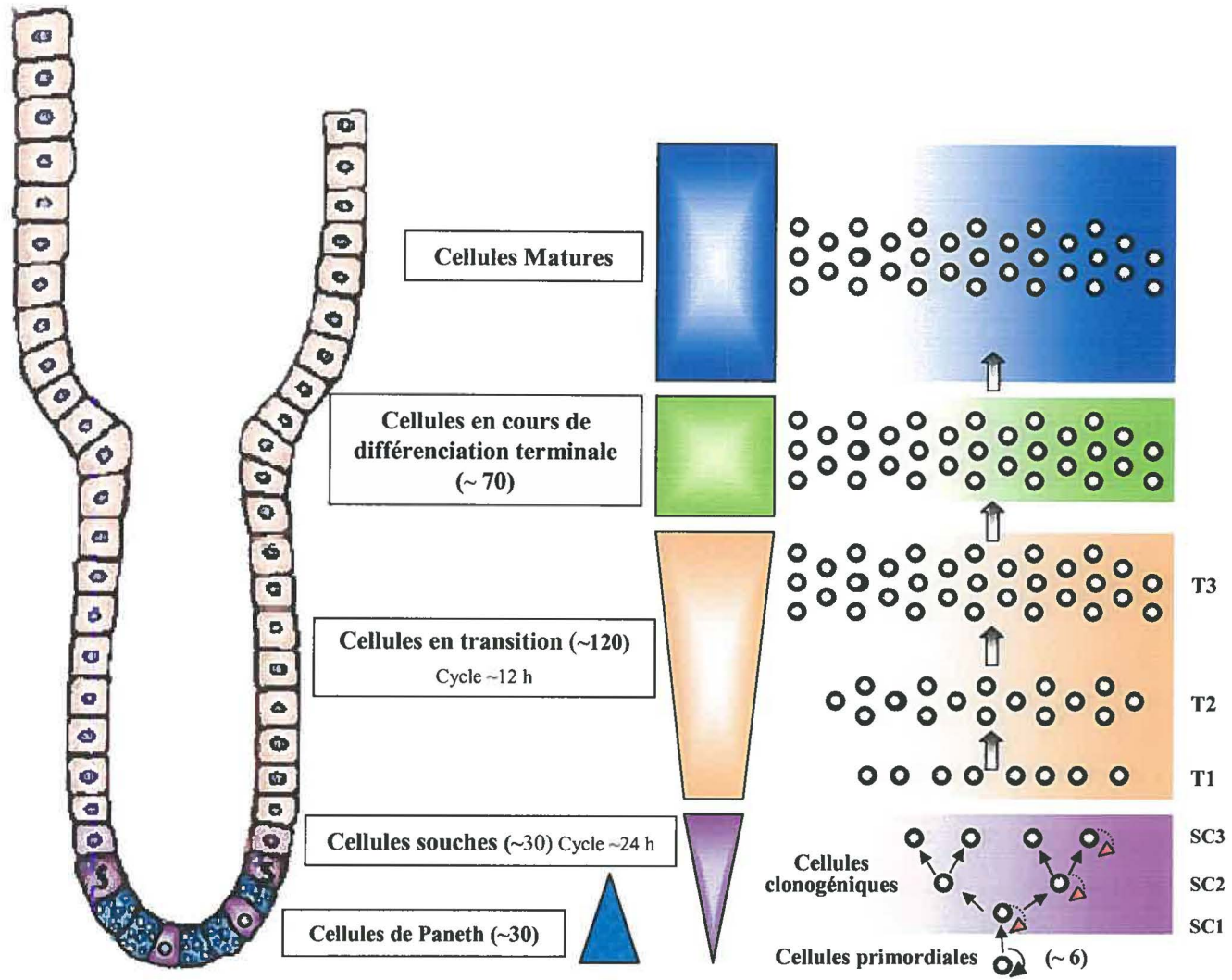
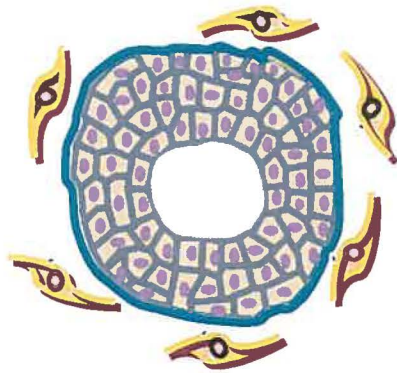


Figure 3. Morphogenèse de la muqueuse intestinale humaine

À partir de la 9^e semaine de vie fœtale, le tube digestif humain amorce un processus morphogénique menant à la formation d'une muqueuse intestinale mature à la mi-gestation.

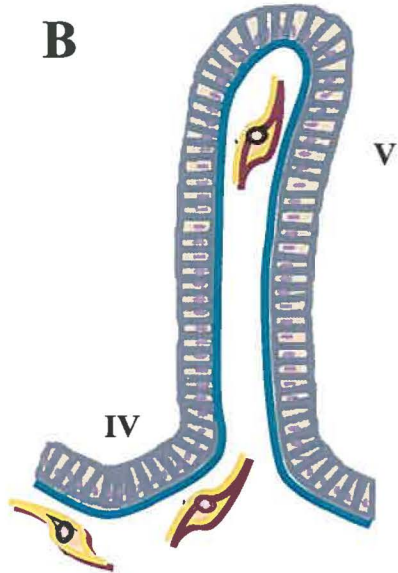
Dans un premier temps, la paroi tubulaire consiste en un épithélium stratifié reposant sur un tissu mésenchymateux (A). Par la suite, le remodelage de la muqueuse donne naissance à des villosités (V), tapissées d'un épithélium cylindrique simple, préservant l'apparence stratifiés des espaces intervillositaires (IV) (B). Vers la 14^e semaine, l'invagination des cellules épithéliales dans le mésenchyme permet le développement de cryptes primitives. Ainsi, vers la 18^e semaine, l'intestin grêle possède une unité fonctionnelle mature, l'axe crypte-villosité (C).

A



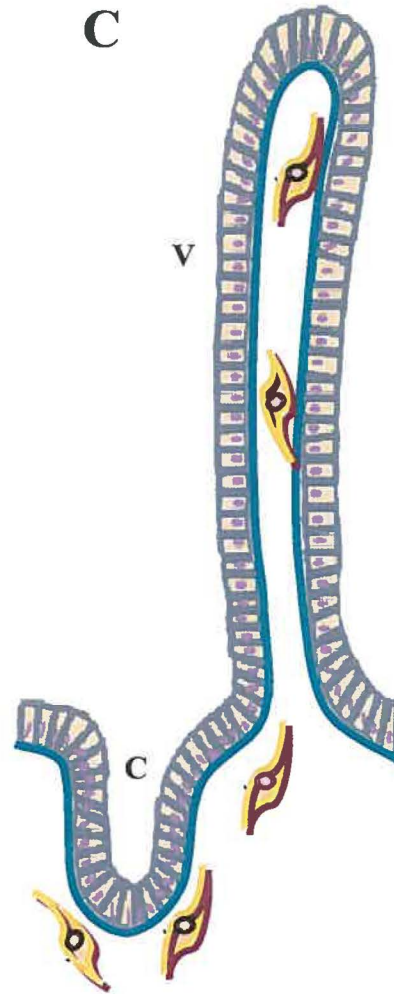
8 semaines

B



9-14 semaines

C



18 semaines - Adulte

2. Niches des cellules souches

L'ensemble des signaux externes contrôlant la destinée des cellules souches constituent un microenvironnement ou une niche (Watt and Hogan, 2000). Cette niche permet de procurer des conditions optimales pour le maintien des fonctions physiologiques exercées par ces cellules (Brittan and Wright, 2004). Les éléments externes composant ce microenvironnement peuvent être divisés en trois groupes distincts : les facteurs sécrétés, les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice extracellulaire.

2.1. Facteurs sécrétés

Plusieurs molécules exogènes contribuent à la régulation du comportement des cellules souches. Parmi ces molécules, les plus caractérisées sont les Wnts, le TGF- β (Transforming Growth Factor β), et les BMPs (Bone Morphogenetic Protein).

Le facteur Wnt, sécrété par le compartiment mésenchymateux, permet l'activation du facteur de transcription TCF-4 via la translocation nucléaire de la β -caténine. Pour sa part, le facteur TCF-4 semble essentiel au maintien de la zone proliférative des cryptes. En effet, les souris mutantes pour le gène *TCF4* ont un épithélium intestinal dépourvu de prolifération cellulaire (Korinek et al. 1998). Un résultat semblable est observé lors d'une expression transgénique de Dickkopf1 (DKK1), un inhibiteur extracellulaire des facteurs Wnt (Glinka et al,

1998; Pinto et al, 2003). Ces phénomènes supposent l'absence de cellules souches fonctionnelles. De plus, l'inactivation de TCF-4 empêche la transcription du gène *Cdx1* connu pour son rôle dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Lickert et al., 2000; Subramanian et al. 1998). Enfin, TCF-4 semble être un facteur déterminant pour l'établissement d'une population cellulaire souche dans les cryptes de l'intestin grêle (Korinek et al. 1998).

Contrairement à la famille des Wnt, la voie du TGF- β permet d'inhiber la prolifération des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Un dysfonctionnement de cette voie de signalisation cause une augmentation de la prolifération cellulaire pouvant mener à la tumorigenèse (Massague, 1998). Ainsi, le TGF- β semble être un facteur important pour l'homéostasie cryptale (Koyama et Podolsky, 1989).

Les BMPs sont d'autres facteurs sécrétés pouvant agir sur l'épithélium intestinal. Cette voie de signalisation joue un rôle important pendant le développement gastro-intestinal (Roberts, 2000; Haramis et al., 2004) et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire au stade adulte (Itoh et al., 2000). Chez un modèle murin, l'expression de BMP-4 se retrouve dans les cellules mésenchymateuses intravillositaires et celles adjacentes aux cryptes (Haramis et al., 2004; He et al., 2004). Cette molécule soluble permet d'inhiber le potentiel de régénération des cellules souches par l'inactivation de la β -

caténine (He et al. 2004). De plus, l'expression exogène de Noggin, un antagoniste des BMPs, dans la région péricryptale semble être requis pour restaurer la voie des Wnt dans le compartiment prolifératif (He et al. 2004). Par conséquent, l'action des BMP-Noggin semble réguler l'activité promotrice de la voie des Wnt sur le renouvellement cellulaire (Reya et al. 2003; He et al., 2004).

2.2. Interactions cellule-cellule

Les molécules solubles produites dans le mésenchyme tels que les Wnt, le TGF- β et les BMPs peuvent atteindre, malgré tout, leurs cibles épithéliales. Par contre, d'autres éléments de la niche requièrent un contact intercellulaire direct. Les récepteurs Notch et EphB, des protéines transmembranaires, sont des exemples d'une signalisation contact-dépendante.

La voie de signalisation du récepteur Notch affecte la détermination des cellules dans une grande variété de tissus incluant l'épithélium intestinal (Karanu et al., 2001; Sander et Powell, 2004; Dontu et al., 2004). L'attribution de caractéristiques spécifiques à une lignée cellulaire s'effectue dans le compartiment prolifératif de l'axe crypte-villosité (de Santa Barbara et al., 2003). L'interaction du récepteur Notch avec son ligand Delta permet d'établir cette diversité cellulaire dans l'épithélium intestinal. En effet, une présence élevée du récepteur membranaire Notch conduit vers une différenciation de type entérocytaire (Yang et al., 2001). Au contraire, une forte expression de ligand

Delta porte la décision vers la promotion d'une lignée cellulaire sécrétrice (cellules de Paneth, à mucus ou entéroendocrines). Par conséquent, la voie de Notch joue un rôle important dans le maintien des fonctions digestives (Sander et Powell, 2004).

Le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal est intimement lié à une migration bi-directionnelle des précurseurs de chacune des lignées (Sancho et al., 2003). Les récepteurs EphB et leur ligand ephrin-B semble nécessaire à la coordination de cette migration cellulaire. En effet, la voie des Wnt semble restreindre les déplacements par l'expression du récepteur EphB3 à la surface des cellules du tiers inférieur des cryptes (Batlle et al., 2002). L'interaction du récepteur avec son ligand ephrin-B, exprimé par les cellules en transit, résulte en une répulsion permettant aux cellules EphB3 de conserver leur localisation cryptale (Wilkinson, 2001; Batlle et al., 2002). De plus, la délétion du gène *EphB3* amène la dispersion des cellules de Paneth dans toutes la cryptes (Batlle et al., 2002). Ainsi, ce système de signalisation intercellulaire permet de conserver l'intégrité de l'épithélium intestinal.

2.3. Interactions cellule-matrice

L'adhésion à la matrice extracellulaire constitue le troisième élément extrinsèque de la niche des cellules souches. Plusieurs classes de récepteur permettent de localiser adéquatement les cellules au sein d'un tissu. La famille des intégrines forme le groupe de récepteurs le plus largement caractérisé.

Durant cette dernière décennie, certaines sous-unités des intégrines ont été identifiées comme marqueur de cellules souches de l'épiderme (Jones et Watt, 1993; Hotchin et al., 1995; Li et al., 1998), de la prostate (Collins et al., 2001) et du système nerveux central (Campos et al., 2004). Dans le modèle épidermique, il est possible d'enrichir une culture en cellules souches par la sélection de cellules possédant une très forte expression d'intégrine $\beta 1$ (Jones et al., 1995; Jensen et al., 1999). De plus, une mutation génétique de ce récepteur amène les cellules souches à se comporter comme des cellules en transit qui se différencient après quelques rondes d'amplification (Zhu et al., 1999). Ainsi, la perte d'un ancrage intégrine $\beta 1$ dépendant provoque le départ des cellules épidermiques indifférenciées et prolifératives du compartiment basal.

De même, les tissus ayant un renouvellement cellulaire très limité possèdent également des cellules souches (Bonkhoff et Remberger, 1996). L'épithélium prostatique humain est un exemple éloquent de l'utilisation des intégrines pour

des fins d'identification et d'isolation de cellules souches. En effet, l'expression soutenue de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines, à la surface de certaines cellules épithéliales de la prostate, corrèle parfaitement avec une habilité à former des colonies et un potentiel de régénération tissulaire (Collins et al. 2001). Enfin, la présence d'un système d'ancrage cellule-matrice efficace permet la séquestration des cellules souches au sein d'un environnement bien défini.

3. Interactions épithélio-mésenchymateuses via la matrice extracellulaire dans le contexte de l'axe crypte-villosité

La morphogenèse de l'intestin et le maintien de ses propriétés fonctionnelles dépendent d'une interaction constante entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent (Kedinger et al., 1998; Roberts et al., 1998; Ratineau et al., 2003). Plusieurs éléments extrinsèques de la niche cellulaire souche témoignent de cette étroite collaboration entre ces deux compartiments tissulaires (Clatworthy et Subramanian, 2001; Brittan et Wright, 2004). En effet, l'établissement de mécanismes complexes de signalisation, entre les cellules épithéliales intestinales et le compartiment mésenchymateux, s'effectue par l'intermédiaire des molécules de la membrane basilaire (Beaulieu, 1997) et des facteurs solubles (cytokines et facteurs de croissances) ainsi que par des contacts intercellulaires (Montgomery et al., 1999).

3.1. Membrane basilaire

La membrane basilaire constitue un feuillet spécialisé de matrice extracellulaire localisé à l'interface épithélio-mésenchymateuse (Leblond et Inoue, 1989). Cette structure apparaît dès les premiers stades du développement embryonnaire et oriente ainsi l'architecture tissulaire (Miner et Yurchenco, 2004; Hagios et al., 1998).

L'assemblage de la membrane basilaire repose sur la formation de deux réseaux protéiques indépendants constitués de collagène de type IV et de laminines respectivement (Timpl, 1996; Erickson et Couchman, 2000; Kalluri, 2003). Ces réseaux distincts sont liés l'un à l'autre par le nidogène (entactine) permettant ainsi l'intégration des protéoglycans (perlecan et agrin) et d'autres glycoprotéines (Sparc/osteonectine/BM40 et fibulin-1/2) (Timpl et Brown, 1996; Lussier et al., 2001; Sasaki et al., 2004). Les membranes basilaires se distinguent entre elles par leur composition macromoléculaire et la distribution spatio-temporelle de ces molécules (Simon-Assmann et al., 1995; Beaulieu, 1997; Miner, 1999; McMillan, 2003). D'autre part, dans la muqueuse intestinale, cette structure résulte d'une contribution partagée entre l'épithélium et le mésenchyme (Perreault et al. 1998; Lefebvre et al., 1999). Ces caractéristiques établissent la nature même des signaux transmis de la matrice extracellulaire aux cellules avoisinantes. En plus de procurer un support mécanique aux cellules, la conformation flexible et dynamique de ce feuillet spécialisé permet

également de réguler les échanges bidirectionnels entre le mésenchyme et l'épithélium (Timpl, 1996; Kleinman et al., 2003).

Dans la muqueuse intestinale, cette matrice extracellulaire peut moduler plusieurs processus biologiques dont l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie des cellules épithéliales. De même, l'influence de la membrane basilaire sur le comportement cellulaire revient, en grande partie, aux différentes isoformes de laminines distribuées le long de l'axe crypte-villosité (Teller et Beaulieu, 2001).

3.2. Laminines

3.2.1. Structure et isoformes

Les laminines représentent les composantes bioactives majeures de la membrane basilaire. Ces macromolécules constituent une grande famille de glycoprotéines hétérotrimériques de haut poids moléculaire (500-1000 kDa) formées par l'association de trois chaînes génétiquement distinctes (α , β et γ). Premier membre de cette famille, la laminine-1 fut isolée en 1979 d'une tumeur Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (Timpl et al., 1979). Depuis sa découverte, la caractérisation de la laminine dans divers tissus a permis l'identification d'un certain nombre de variants pour chacune des chaînes (Tunggal et al. 2000; Teller et Beaulieu, 2001). Jusqu'à présent, l'agencement

des différentes sous-unités permet la formation d'au moins 12 isoformes différentes (Colognato et Yurchenco, 2000; Tunggal et al., 2000).

3.2.2. Laminines dans le contexte de l'axe crypte-villosité

Dans la muqueuse de l'intestin grêle humain, les laminines 1 ($\alpha1\beta1\gamma1$), 2($\alpha2\beta1\gamma1$), 5($\alpha3\beta3\gamma2$) et 10($\alpha5\beta1\gamma1$) sont les formes prédominantes. L'expression de chacune de ces isoformes est assujettie à des contraintes spatio-temporelles au cours du développement (Figure 4). Cette régulation étroite semble être associée à des événements morphogéniques importants. Tout d'abord, au moment de la formation des villosités, entre la 8^e et 10^e semaine de gestation, la laminine-1 se concentre graduellement à l'espace intervallositaire pour être remplacée par la laminine-2 à la naissance du compartiment cryptal (Teller, Auclair et al., 2002). Au stade adulte, la laminine-2 est la seule isoforme exprimée exclusivement dans les cryptes (Beaulieu et Vachon, 1994). Dans un deuxième temps, la redistribution des laminines ubiquitaires 5 et 10 s'opère dès l'apparition des projections villositaires. Dans un intestin grêle mature, ces dernières se localisent au tiers supérieur des cryptes ainsi que dans les villosités (Teller et Beaulieu, 2001).

3.2.3. Laminines: morphogénèse, prolifération, adhésion et survie cellulaire

Les fonctions biologiques des laminines, dans le contexte de l'axe crypte-villosité, semblent être liées à leur distribution. Dans la muqueuse intestinale humaine, les laminines-1 et 2 sont principalement associées aux zones prolifératives de l'épithélium. De même, certains auteurs s'avancent quant au rôle que pourrait jouer la laminine-2 au sein de la niche des cellules souches de l'épithélium intestinal adulte (Potten et al., 1997; Simon-Assmann et al., 1998).

L'avancement des techniques d'analyses démontrent que la laminine-1 est essentielle à la formation d'une membrane basilaire au stade embryonnaire (Li et al., 2002, 2003; Miner et Yurchenco, 2004). La laminine-1 semble aussi jouer un rôle important dans la morphogénèse de plusieurs tissus épithéliaux (Sorokin et al. 1992; Ekblom et al., 1998, 2003; Durbeej et al. 2001). De même, l'association de la laminine-2 avec le développement des glandes gastriques (Tremblay et Ménard, 1996) et des cryptes intestinales humaines (Perreault et al., 1995) supporte l'hypothèse d'une implication de cette isoforme dans l'architecture glandulaire. Toutefois, l'analyse de l'intestin d'une souris mutante pour la chaîne $\alpha 2$ des laminines n'a apporté aucune évidence d'un tel rôle. Contrairement à l'intestin grêle adulte humain, la chaîne $\alpha 1$ est également présente dans les cryptes de souris (Kedinger et al., 1998; Gawlik et al., 2004) et semble donc compenser pour l'absence de la chaîne $\alpha 2$. Néanmoins, l'analyse de spécimens d'intestin grêle affecté par la maladie de Crohn semble indiquer que la perte de la laminine-2 pourrait être associée à la

désorganisation de la crypte (Bouatrouss et al., 2000). De même, la mutation du gène *LAMA2* codant pour la chaîne $\alpha 2$ des laminines constitue la cause majeure de dystrophie musculaire congénitale (Helbling-Leclerc et al., 1995; Brockington et al., 2001). En plus des symptômes musculaires, cette pathologie présente également des complications reliés à des dysfonctions du tractus digestif (Ronblom et al., 1998,1999; Ronblom et Danielsson, 2004). Toutefois, aucune investigation exhaustive n'a été produite sur les spécimens intestinaux provenant de ces patients.

D'autre part, des études ont permis d'établir un lien entre la distribution complémentaire de la laminine-2 et 10, le long de l'axe crypte-villosité, et l'apparition précoce de marqueurs de différenciation fonctionnels chez les cellules Caco-2/15, un modèle entérocytaire humain (Beaulieu et Vachon, 1994; Vachon et Beaulieu, 1995). Ces résultats permettent l'exclusion de la laminine-2 pour un rôle instructif dans la différenciation des entérocytes. En effet, par sa localisation dans le tiers inférieur des cryptes, elle se voit plutôt attribuer un rôle dans la prolifération des cellules épithéliales et dans la différenciation des cellules de Paneth (Simon-Assmann et al., 1994).

En plus d'une implication dans la morphogenèse et la prolifération, les laminines permettent également la régulation de l'adhésion et la survie cellulaire. Les propriétés adhésives des isoformes trimériques reflètent des différences tant dans leur cinétique d'adhésion que dans leurs impacts sur

l'aspect morphologique des cellules (Turck et al., 2005). De plus, la matrice extracellulaire affecte la survie des cellules adhérentes (Meredith et al., 1996). Une perte de cette interaction cellule-matrice induit une forme d'apoptose, l'anoïkose. Par conséquent, la laminine-2 est un promoteur important de la survie cellulaire et supprime l'anoïkose des myofibres squelettiques (Vachon et al., 1996; Laprise et al., 2002). Enfin, l'effet des laminines sur le comportement cellulaire implique nécessairement l'activation de récepteurs à la surface des cellules (Beaulieu, 1999; Lussier, 2000).

3.3. Récepteurs des laminines

Les fonctions biologiques des laminines sont directement reliées au potentiel d'interaction que possède une cellule via l'expression d'un répertoire spécifique de récepteurs. Parmi ce répertoire, plusieurs récepteurs provenant de la famille des intégrines ainsi que le dystroglycan ont été identifiés dans divers tissus.

3.3.1. Intégrines

Les intégrines constituent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires composées d'une sous-unité α et β (Humphries, 2000). Jusqu'à présent, dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β permettent la génération d'au moins 24 hétérodimères fonctionnels chez l'humain (Plow et al. 2000; Danen et Sonnenberg, 2003). De même, l'association des différentes sous-

unités confère aux récepteurs leur spécificité de liaison et de signalisation (van der Flier et Sonnenberg, 2001). Les intégrines peuvent lier divers types de ligands dont principalement les protéines de la matrice extracellulaire (Albelda et Buck, 1990). Cette interaction s'effectue par l'intermédiaire des deux sous-unités via leur domaine globulaire extracellulaire (Humphries, 2000; van der Flier et Sonnenberg, 2001). La liaison des intégrines aux composantes de la membrane basilaire provoque un changement conformationnel du domaine cytoplasmique et permet le recrutement de protéines intracellulaires. Ces molécules assurent l'ancrage des récepteurs au cytosquelette d'actine menant ainsi à la formation de structures adhésives matures (van der Flier et Sonnenberg, 2001). En plus de procurer un lien dynamique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, les intégrines participent également à une signalisation bidirectionnelle. Les phénomènes de transduction de signal attribués aux intégrines résultent d'une association étroite avec des protéines adaptatrices. Ces dernières permettent aux intégrines d'interagir indirectement avec les kinases cytoplasmiques ainsi que les récepteurs de facteurs de croissance (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Dans la muqueuse de l'intestin grêle humain, plusieurs isoformes d'intégrine ont été identifiées et caractérisées (Beaulieu, 1999; Lussier et al., 2000). Parmi les intégrines liant les laminines, les entérocytes expriment les récepteurs $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ (Basora et al., 1999; Belkin et Stepp, 2000; Teller et Beaulieu, 2001). Au sein de l'axe crypte-villosité, l'expression

de certaines de ces isoformes subit une régulation spatio-temporelle au cours du développement. Au stade adulte, les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ sont les seules isoformes fonctionnelles exclusivement exprimées dans le compartiment cryptal (Figure 5) (Beaulieu, 1992; Basora et al., 1999). Par conséquent, ces deux récepteurs semblent être des candidats potentiels pour l'adhésion des cellules épithéliales à la laminine-2.

3.3.1.1. Intégrine $\alpha1\beta1$

L'intégrine $\alpha1$ possède un seul partenaire, la sous-unité $\beta1$, et cet hétérodimère favorise des interactions cellule-matrice via diverses isoformes de collagène et de laminine (Pfaff et al. 1994; Gardner et al., 1996; Calderwood et al. 1997; Colognato et al., 1997; Ettner et al., 1998; Lussier et al. 2000). La sous-unité $\alpha1$ appartient à un sous-groupe d'intégrines, comprenant entre autres les sous-unités $\alpha2$, $\alpha10$ et $\alpha11$, où l'activité de liaison réside dans le domaine I, une structure extracellulaire. L'intégrine $\alpha1\beta1$ se lie au bras court de la chaîne α des laminines, tout comme l'intégrine $\alpha2\beta1$ (Ettner et al., 1998). *In vitro*, ces interactions supportent l'adhésion cellulaire mais dans le contexte du développement et du maintien de l'intégrité tissulaire leurs impacts sur les processus biologiques sont encore inconnus (Miner et Yurchenco, 2004).

Chez l'humain, l'intégrine $\alpha1\beta1$ est principalement exprimée dans les tissus musculaires lisses (Belkin et al., 1990; Heino, 2000), les cellules myoépithéliales

des glandes mammaires (Glukhova et al. 1995), les chondrocytes (Loeser et al., 1995), les cellules endothéliales (Senger et al., 1997) et les cellules mésangiales des glomérules (Korhonen et al., 1990). Ce récepteur est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, la prolifération, la survie ainsi que la réorganisation de la matrice extracellulaire. Les souris mutantes pour la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines sont viables et fertiles (Gardner et al. 1996). Par contre, une analyse détaillée démontre que le derme de ces animaux apparaît hypocellularisé. En effet, la perte de ce récepteur affecte la croissance et la survie des cellules fibroblastiques via la voie Ras-MAP kinase (Pozzi et al. 1998; De Arcangelis et Georges-Labouesse, 2000). De même, une régulation anormale de la synthèse de collagène et de l'expression des métalloprotéinases de la matrice est également observée (Langholz et al., 1995; Gardner et al. 1999; Pozzi et al., 2000; Tulla et al., 2001). Les informations provenant des souris mutantes pour le gène *ITGA1* révèlent que cette intégrine joue un rôle secondaire au cours du développement. Par contre, ce récepteur semble être associées à des phénomènes physio-pathologiques comme l'angiogenèse tumorale (Pozzi et al., 2000), la fibrose (Gardner, 1999) et l'inflammation chronique (MacDonald et al., 1990; Fiorucci et al., 2002). De même, l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée dans la déposition anormale de la chaîne $\alpha 2$ des laminines à la membrane basilaire des glomérules affectés par le syndrome d'Alport (Cosgrove et al., 2000; Sampson et al., 2001).

En culture cellulaire, l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ peut être régulée par des facteurs de croissance (NGF, TGF- $\beta 1$, PDGF, TNF et VEGF) et l'acide rétinoïque (Duband et al. 1992; Gardner et al., 1996; Hong et al., 2004). Ces facteurs sécrétés permettent ainsi de moduler l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ lors de différents processus physio-pathologiques.

Dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte, l'expression de cette intégrine est relativement restreinte et se limite au domaine basolatéral des cellules cryptales (Beaulieu, 1992). Au contraire, le patron d'expression de la sous-unité $\alpha 1$ est inconnu au cours du développement foetal humain. De même, les connaissances actuelles sur le rôle potentiel de la sous-unité $\alpha 1$, dans la muqueuse intestinale, sont très limitées.

3.3.1.2. Intégrine $\alpha 2\beta 1$

Récepteur des laminines et des collagènes, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est principalement exprimée par les cellules d'origine épithéliale (Cognato et al., 1997; Wang et al., 2000). Dans l'épithélium intestinal adulte, elle se localise au domaine basolatéral des cellules du fond de la crypte jusqu'à la base du compartiment villositaire (Beaulieu, 1992; Lussier et al., 2000). Au cours du développement, cette isoforme est présente dès la 7^e semaine de gestation et se localise aux espaces intervillaires à la naissance des villosités. Par la suite, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ reste confinée au compartiment cryptal (Perreault et al. 1995).

Le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'activation des voies de prolifération est type cellulaire spécifique (Schwartz et Assoian, 2001). Dans les cellules Caco-2, un modèle intestinal, l'intégrine $\alpha 2$ stimule la prolifération cellulaire et restreint l'expression de marqueurs de différenciation (Basson et al., 2000). Cette intégrine est également impliquée dans l'architecture tubulaire et glandulaire de certains tissus ainsi que dans la survie cellulaire (Saelman et al., 1995; Zutter et al. 1999; Zhang et al., 2003; Chen et al., 2004). En effet, chez la souris, la mutation du gène *ITGA2* limite le développement des glandes mammaires en réduisant le nombre de ramifications (Chen et al., 2002). Une autre fonction attribuée à cette isoforme est la participation au remodelage de la matrice extracellulaire (Heino, 2000; White et al., 2004). Des études ont démontré que l'interaction de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ avec des matrices de collagène pouvait augmenter l'expression transcriptionnelle des métalloprotéases de la matrice (MMPs) (Langholz et al., 1995).

In vitro, certains facteurs de croissances tels que l'EGF, le TGF- $\beta 1$ et le VEGF augmentent l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans divers contextes cellulaires (Belkin et Stepp, 2000; Yamanaka et al., 2003; French-Constant et Colognato, 2004; Hong et al., 2004). Cette augmentation procure un moyen par lequel les facteurs de croissances peuvent maximiser les réponses cellulaires dans les régions où la matrice extracellulaire est peu abondante (French-Constant et Colognato, 2004).

3.3.2. Dystroglycan

La grande famille des intégrines n'est pas seule responsable de l'adhésion cellulaire. D'autres types de récepteurs ont la capacité de lier les laminines de la membrane basilaire. Dans les tissus musculaires, par exemple, le dystroglycan est un des principaux systèmes d'ancrage cellulaire reconnu pour son interaction avec les laminines-1 et 2 (Ervasti et Campbell, 1993). Ce récepteur est un hétérodimère protéique composé de sous-unités α et β issues d'un transcrit unique (Figure 6) (Ibraghimov-Beskrovnaya., 1993). La production de deux sous-unités distinctes s'effectue par un clivage protéolytique du précurseur (Holt et al., 2000; Winder, 2001; Esapa et al., 2003).

La sous-unité α est une protéine de surface hautement glycosylée dont le poids moléculaire (120-180 kDa) varie selon l'origine tissulaire et le stade du développement (Leschziner et al., 2000; Durbeej et Campbell, 1999). Elle lie avec une haute affinité les protéines de la matrice extracellulaire telles que les laminines, l'agrin et le perlecan, d'une manière calcium dépendante (Losasso et al., 2000). La liaison dystroglycan-laminine peut être inhibée par l'héparine. Cette molécule partage avec le dystroglycan un site de liaison sur la laminine-1 aux modules LG 4-5 du domaine globulaire de la chaîne α (Scheele et al., 2005). Contrairement à ce qui est observé avec cette isoforme, l'adhésion cellulaire à la laminine-2 reste insensible à l'action de l'héparine (Pall et al., 1996; Shimizu et al., 1999; Talts et Timpl, 1999; Smirnov et al., 2002).

Contrairement à la sous-unité α , la protéine transmembranaire β conserve un poids de 43 kDa dans un contexte biologique normal. La portion cytoplasmique de cette dernière permet des interactions avec des protéines cytoplasmiques comme les dystrophines, l'utrophine et Grb2, une protéine adaptatrice des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance (Durbeej et al., 1998; Lossaso et al. 2000). Ainsi, le dystroglycan permet la formation d'un lien continu entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine (Henry et Campbell, 1996; Winder, 2001).

Chez l'humain, l'expression du dystroglycan est très abondante dans les muscles squelettiques et cardiaques (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). En plus des tissus musculaires, le récepteur est exprimé à la membrane des cellules de Schwann du système nerveux périphérique et de certaines cellules du système nerveux central (Ushino et al., 1996; Matsumura et al., 1997; Montanaro et Carbonetto, 2003). De même, on le détecte également dans les tissus d'origine épithéliale tels que les poumons et les reins (White et al., 2001).

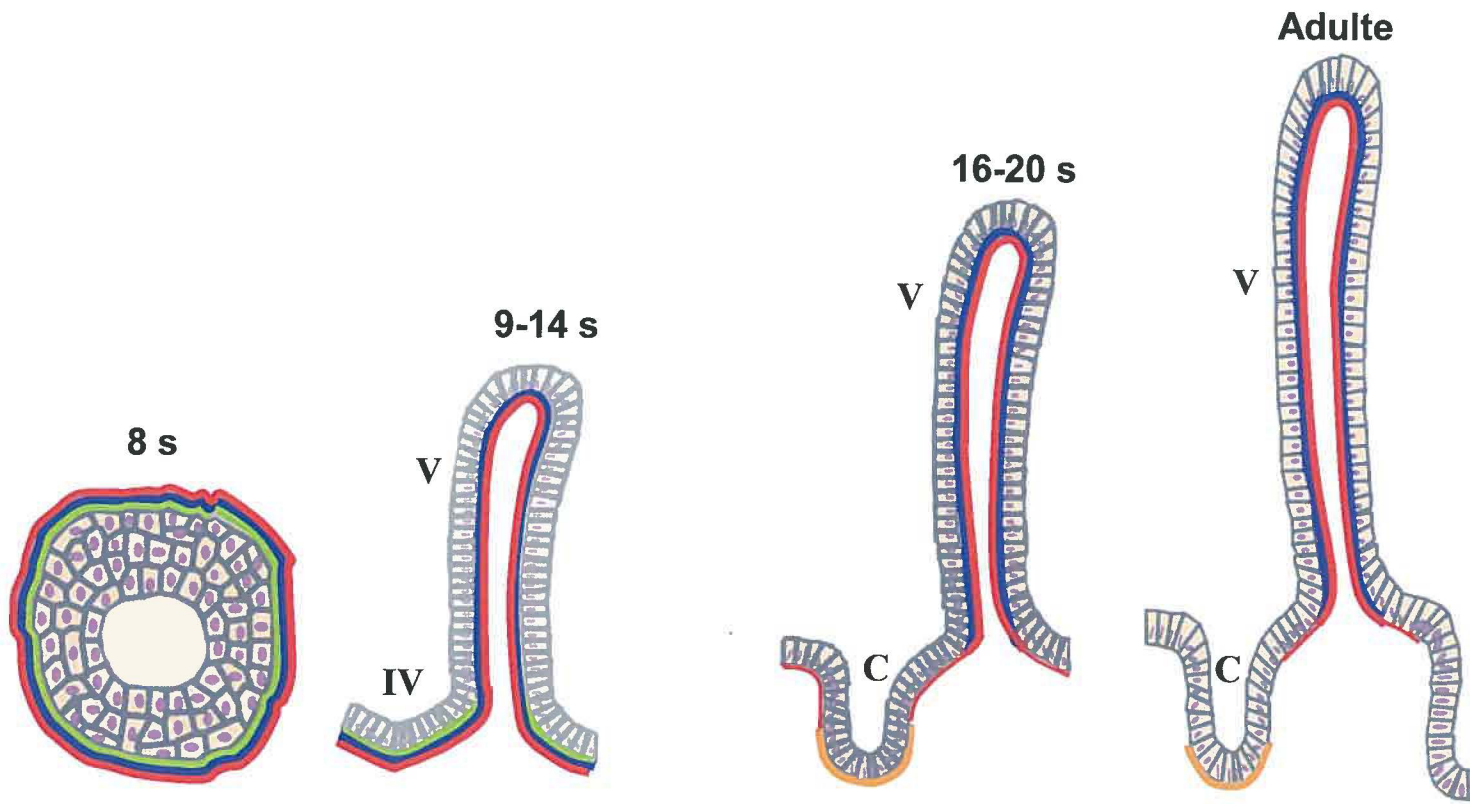
Le dystroglycan est impliqué tôt dans le développement embryonnaire de la souris. En effet, la délétion du gène *DAG1* provoque un arrêt du développement précédant le jour 5 embryonnaire (Williamson et al., 1997). À ce jour, aucune maladie génétique n'a été associée au dystroglycan chez l'être humain. Toutefois, la létalité embryonnaire observée chez la souris suggère que ce gène

serait tout aussi important pour l'homme (Durbeej et al., 1998). Le dystroglycan participe également à plusieurs processus physiologique et cellulaire tels que l'adhésion, la morphogenèse des épithéliums, la myélinisation, la synaptogenèse et semble important pour le maintien de la barrière hémato-encéphalique (Henry et campbell, 1996; Tian et al., 1996; Durbeej et al., 1995,1998). En plus, dans les cellules musculaires, l'interaction dystroglycan-laminine permet la propagation des signaux de survie par l'activation de la voie PI3K/AKT (Langenbach et Rando, 2002)

Les informations disponibles sur l'expression et la localisation du dystroglycan dans l'intestin grêle se résument à une seule étude histologique produite chez la souris (Durbeej et al., 1998). Dans ce modèle, le récepteur est présent à la base de l'épithélium intestinal dans la région des cryptes. Pour l'intestin grêle humain, l'expression et les fonctions du dystroglycan sont encore inconnues.

Figure 4. Distribution des laminines dans l'axe crypte-villosité au cours du développement de l'intestin grêle humain

Au cours du développement, les laminines-1 (vert) , -5 (bleu) et -10 (rouge) sont les premières isoformes présentes dans la membrane basilaire intestinale. À la 12^e semaines, la laminine-1 est confinée à l'espace intervillositaire (IV), tandis que les laminines-5 and -10 sont détectées à l'interface épithélio-mésenchymateux de tout l'épithélium. Dès la formation des cryptes (C) (16^e semaines) la laminine-1 est graduellement substituée par la laminine-2 (orange), alors que l'expression des laminines-5 and -10 devient de plus en plus limitée aux villosités (V). Dans l'intestin grêle adulte, les laminines-2 et -10 adoptent une distribution complémentaire le long de l'axe crypte-villosité, tandis que l'expression de la laminine-5 est essentiellement restreinte au compartiment villositaire.



Laminine-1 ($\alpha 1$) —

Laminine-5 ($\alpha 3$) —

Laminine-10 ($\alpha 5$) —

Laminine-2 ($\alpha 2$) —

Laminine-5 ($\alpha 3$) —

Laminine-10 ($\alpha 5$) —

Figure 5. Distribution des intégrines récepteurs de laminines dans l'intestin grêle adulte

Représentation schématique, dans la membrane basilaire, de la distribution des intégrines impliquées dans les interactions de type cellule-laminine. Le niveau d'expression de chaque sous-unité est représenté par la largeur de la bande correspondante. Pour la sous-unité $\beta 4$, le segment hachuré souligne la présence d'un variant cytoplasmique dans le compartiment cryptal. De même, la distribution de ces molécules est illustrée en fonction de l'axe-crypte villosité retrouvée à la gauche de la figure.

Adulte

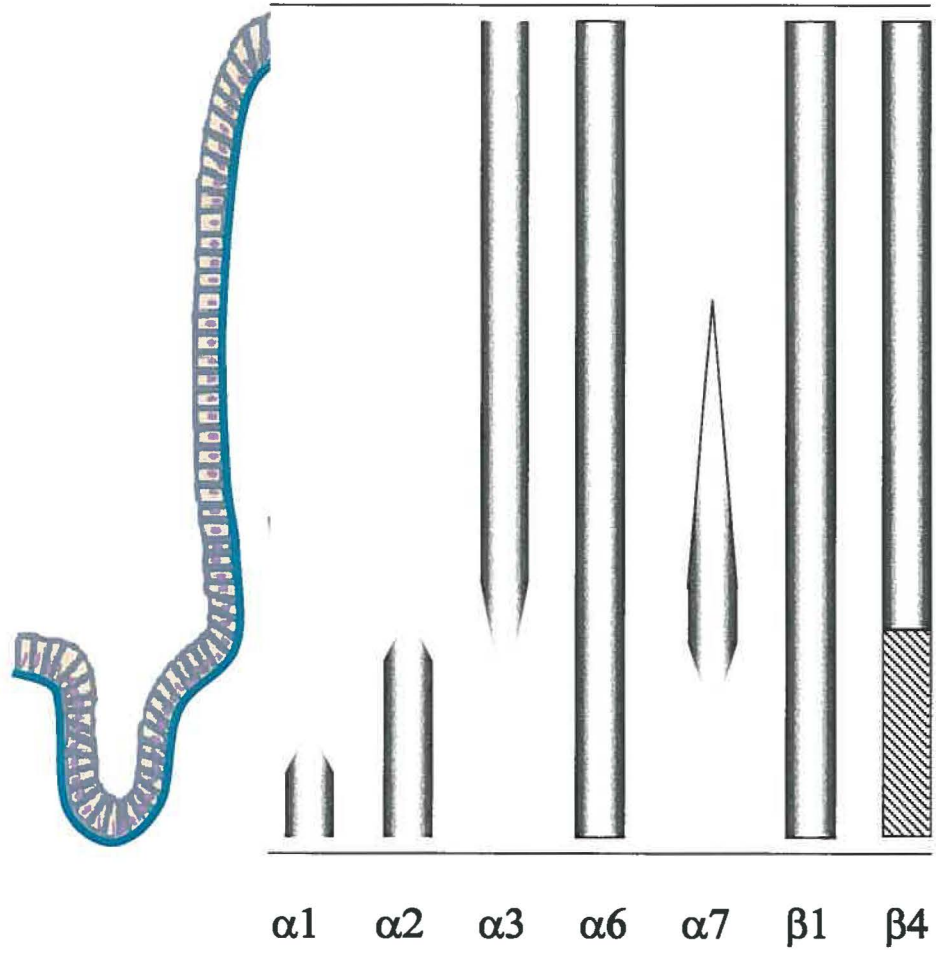


Figure 6. Le dystroglycan

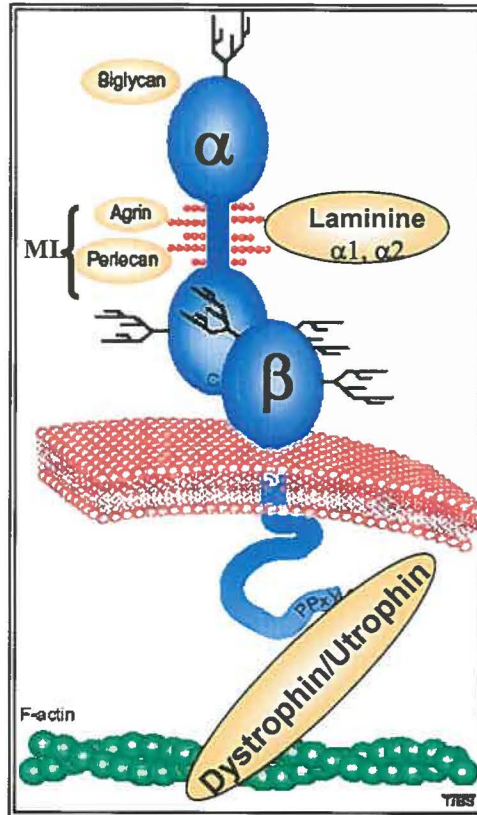
A. Représentation du dystroglycan et de ses ligands à la surface cellulaire.

L' α -dystroglycan extracellulaire et le β -dystroglycan membranaire sont illustrés en bleu. L'Agrin, le perlecan et les laminines se lient aux hydrates de carbones de la région mucine-like (ML) de l' α -dystroglycan. Au contraire, le biglycan se lie en N-terminal de l' α -dystroglycan dans une région non-glycosylée. Du côté intracellulaire, la queue cytoplasmique du β -dystroglycan interagit, entre autres, avec la dystrophine ou l'utrophine.

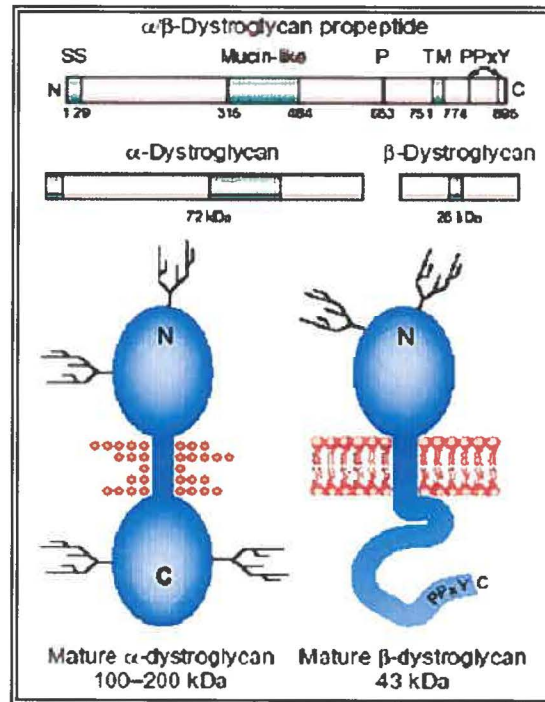
B. Production des sous-unités α et β du dystroglycan

L' α/β -dystroglycan est le produit du gène *DAG1* uniquement. La synthèse des deux sous-unités provient du clivage protéolytique (P) d'un seul propeptide. De plus, la glycosylation est nécessaire pour l'expression adéquate du récepteur à la surface cellulaire.

A



B



Tirée et modifiée de Winder, 2001

4. Problématique et objectifs du projet de recherche

Les connaissances actuelles concernant le microenvironnement des cellules souches de l'épithélium intestinal sont limitées. De plus, rien n'est connu sur leur mode d'ancrage à la matrice extracellulaire. Par contre, la co-localisation de la laminine-2 et de l'intégrine $\alpha1\beta1$ au voisinage des cellules souches, dans l'intestin grêle adulte suggère une certaine implication de ces molécules dans l'attachement des cellules pluripotentes à la matrice extracellulaire (Beaulieu, 1992; Beaulieu et Vachon, 1994).

L'objectif principal de ce projet de recherche était donc d'identifier des mécanismes d'ancrage potentiels via la laminine-2 permettant aux cellules du compartiment souche d'échapper au courant migratoire ascendant de l'axe crypte-villosité. Les objectifs spécifiques étaient de:

- 1) Déterminer l'expression et la distribution de l'intégrine cryptale $\alpha1\beta1$ au cours du développement intestinale humain ainsi que dans les modèles cellulaires.
- 2) Poursuivre la caractérisation de l'intégrine $\alpha2\beta1$ dans l'épithélium intestinal humain.

- 3) Définir l'impact du facteur de croissance épidermique et des glucocorticoïdes, des régulateurs du développement intestinal, sur la mise en place d'un système d'ancrage intégrine dépendant au cours de la formation des cryptes.

- 4) Caractériser l'expression et les fonctions adhésives du dystroglycan, un récepteur potentiel pour l'ancrage des cellules souches à la laminine-2, dans la muqueuse intestinale humaine.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Tissus fœtaux et adultes

Les spécimens d'intestin grêle de fœtus âgés entre 9 et 20 semaines étaient récupérés à la suite d'interruptions légales de grossesse réalisées au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Les segments intestinaux adultes étaient obtenus de donneurs sains (25 à 75 ans) en collaboration avec un organisme de don d'organes, Québec-Transplant. Ces procédures étaient en conformité avec les protocoles établis et approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke.

2. Culture *in vitro*:

2.1. Culture cellulaire : HIEC-6 (Human Intestinal Epithelial Cells)

La lignée cellulaire HIEC-6 a été générée dans notre laboratoire (Perreault et Beaulieu, 1996). Les cellules étaient cultivées dans des plats de Pétri en plastique de 100 mm (Falcon, Becton-Dickinson) à 37°C, dans une atmosphère contrôlée comportant 95% d'air et 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé était l'Opti-MEM I (GIBCO) contenant 4% de FBS (CELLect GOLD, ICN Biomedicals), 10 mM HEPES, 2 mM de glutamine (gluta MAX II, GIBCO) et 5ng/ml d'EGFh (BD Biosciences). À tous les deux jours, le milieu de culture était remplacé par 10ml

de milieu frais. Le passage des cellules HIEC-6 s'effectuait 1 : 3 avant l'atteinte de la confluence (~95%).

2.2. Culture organotypique

La méthode de culture organotypique d'intestin grêle foetal humain était celle décrite précédemment (Ménard et Arsenault, 1985). Brièvement, les explants étaient placés sur du papier lentille supporté par une grille en acier inoxydable. Cette grille était disposée à la surface d'un puits central d'un plat Falcon pour la culture organotypique. De cette façon, ce réservoir de milieu de culture pouvait conserver le papier lentille humide. Ainsi, les spécimens étaient gardés à l'interface milieu/atmosphère. Les tissus étaient incubés à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% CO₂ et cultivés dans le milieu Leibovitz L-15 (enrichi en gentamicine et nystatine) contenant 4% de FBS, 10 mM HEPES et 2 mM de glutamine. Les explants étaient traités ou non avec 100 ng/ml d'EGFh et/ou 1µM de dexaméthasone hydrosoluble (sigma). Le milieu de culture et les traitements étaient renouvelés après 48 heures. La récupération des spécimens s'effectuait après 48 ou 72 heures. Par la suite, les explants étaient inclus dans l'O.C.T., congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses ultérieures par d'immunofluorescence indirecte.

3. Immunofluorescence Indirecte

3.1. Préparation des échantillons

Après la récupération, les tissus étaient rapidement inclus dans une résine d'O.C.T (Optimum Cutting Temperature, Tissue-tek, Canemco-Marivac), congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. De ces spécimens, des coupes de 3µm d'épaisseur étaient produites à l'aide d'un cryostat (CM3050, LEICA) et transférées sur des lames de verre préalablement salinisées (Sigma) puis séchées à 37°C pendant 30 minutes. Les lames étaient ensuite placées à -80°C afin de préserver l'intégrité tissulaire. Pour l'analyse par immunofluorescence indirecte, les lames devaient être décongelées 30 min avant le début de l'expérience.

3.2. Procédure d'immunofluorescence indirecte

3.2.1. Immunodétection simple

Les spécimens étaient fixés par immersion dans l'éthanol ou le méthanol à -20°C pendant 10 minutes, ou dans le para-formaldéhyde 2% dans du PBS, pH 7.4, pendant 60 minutes. Le type de fixation dépendait de l'anticorps primaire utilisé (tableau 1). Avant de passer à l'étape suivante, les spécimens étaient rincés au PBS. L'incubation des tissus dans une solution de PBS-glycine 100 mM, après la fixation au para-formaldéhyde, était utilisée pour saturer les groupements aldéhydes libres. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les

spécimens étaient recouverts, pendant 30 minutes, d'une solution de PBS contenant 10% de lait en poudre écrémé ou 2% de BSA (tableau 1). Par la suite, une dilution d'anticorps primaires dans la solution bloquante était appliquée sur les tissus. L'incubation des anticorps primaires pouvait varier d'une heure à deux heures à température pièce jusqu'à une nuit entière à 4°C (tableau 1). Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires anti-Ig de souris ou de lapin conjugués à la fluorescéine étaient ensuite ajoutés sur les échantillons et incubés à l'abri de la lumière pendant une heure à la température de la pièce. Après l'incubation des anticorps secondaires, les spécimens étaient rincés dans le PBS puis colorés dans une solution d'Evan Bleu pendant une minute (0,001% dans le PBS). Pour enlever l'excès de colorant, les échantillons étaient lavés pour une dernière fois. Pour certaines applications, les noyaux des cellules étaient colorés au DAPI pendant 2 minutes (1/5000 dans l'eau distillée). Finalement, une solution de montage de glycérol-PBS (9 : 1) contenant 0,1% de para phénylène diamine (Johnson et Nogueira Araujo, 1981) était appliquée sur les spécimens. L'analyse était réalisée à l'aide des microscopes à fluorescence Reichert Polyvar 2 (Leica Instruments) ou DM-RXH (LEICA).

3.2.2. Immunodétection double

Pour réaliser la procédure d'immunofluorescence indirecte à double marquage certaines étapes du protocole classique étaient modifiées. Premièrement, deux anticorps primaires produits par des espèces différentes étaient utilisés (ex.

souris et lapin). L'incubation des anticorps primaires était effectuée en une seule étape par l'addition sur les spécimens d'une solution contenant les deux anticorps. La révélation en double marquage des antigènes était produite par des anticorps secondaires anti-Ig de souris conjugués à la fluorescéine et anti-Ig de lapin conjugués à la rhodamine ou l'inverse. L'étape de la coloration à l'Evan bleu était omise pour éviter de masquer l'immunodétection à la rhodamine.

Tableau 1. Anticorps utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps Primaires					
Antigène	Clone Type (M/P)	Hôte	Dilution	Conditions	Références Compagnies
Intégrine $\alpha 1$	TS2/7 (M)	S	1:10	F: Éthanol, B: Blotto 10% I: 2h à T.P.	Sérotec et Endogen
Intégrine $\alpha 2$	P1E6 (M)	S	1:200	F: Méthanol B: Blotto 10% I: 2h à T.P.	Chemicon
α -Dystroglycan	V1A4-1 (M)	S	1:500	F: Éthanol B: BSA 2% I: O/N 4°C	Upstate
β -Dystroglycan	43-DAG1/8D5 (M)	S	1:200	F: Éthanol B: Blotto 10% I: O/N 4°C	NovoCastr Laboratories
Phospholipase A2 groupe II	(P)	L	1:1000	F: P-formaldéhyde B: Blotto 1% I: O/N 4°C	Nevalainen TJ et al. 2001
Laminine- $\alpha 2$	5H2 et 2G9 (M)	S	1:200	F: Éthanol B: Blotto 10% I: 1h à T.P.	Chemicon (5H2) Engvall E et al. 1994 (2G9)
Laminine- $\gamma 1\beta 1$	(P)	L	1 :1000	F: Éthanol B: Blotto 10% I: O/N 4°C	Serotec
Anticorps secondaires					
Anticorps	Fluochrome conjugué		Dilution	Compagnies	
Anti-IgG de souris	Fluorescéine ou Rhodamine		1:25	Chemicon	
Anti-IgG de lapin	Fluorescéine ou Rhodamine		1 :25	Chemicon	

Légende:

Type: monoclonal (M), polyclonal (P)

Hôte: souris (S), lapin (P)

Conditions : fixation (F), solution bloquante (B) et incubation pour l'anticorps primaire (I)

4. Immunobuvardage Western

4.1. Extraction protéique

Pour certains échantillons, différents traitements étaient appliqués aux cellules HIEC-6 pendant les 72 heures précédant l'extraction protéique. À la suite d'un passage, les cellules étaient cultivées en présence de 20 ng/ml d'EGF, 0,1 μ M de dexaméthasone ou la combinaison EGF/dexaméthasone. Les milieux contrôles et traités étaient remplacés à toutes les 24 heures. Afin de prélever les protéines, le milieu de culture était aspiré des plats de Pétri contenant les cellules et ces dernières étaient lavées deux fois au PBS. À chacun des plats de Pétri était ajouté un tampon de solubilisation 1X (tampon Tris-HCL 0,0625M pH 6,8; 2,3% de sodium dodécyl sulfate (SDS); 10% glycérol; 0,001% de bleu de bromophénol; 5% de β -mercaptoéthanol) et les cellules étaient récupérées. Pour libérer les protéines, les échantillons étaient soumis à la sonication avec un sonicateur de type Ultrasonic Processor XL (Mandel Scientific Compagny) pendant 10 secondes à une intensité de 2,5. Les extractions protéiques étaient ensuite chauffées pendant 5 minutes à 95°C et centrifugées à 13 000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants étaient récupérés et conservés à -80°C.

4.2. Migration des protéines sur gel SDS-PAGE

Les gels séparateurs utilisés étaient de type Thomas et Kornberg (Thomas et Kornberg, 1975) et étaient composés de 10 à 15% d'acrylamide (rapport acrylamide : bis-acrylamide 30 : 0,15), 0,075 M de Tris-HCl pH 8,8 et 1% SDS. Les gels d'entassement (4% acrylamide rapport acrylamide : bis-acrylamide 29:1, 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 et 1% SDS) étaient employés afin de concentrer les protéines à l'entrée des gels séparateurs. Pour l'électrophorèse, les gels de polyacrylamide étaient immergés dans un tampon contenant 0,1% SDS, 0,38 M de glycine et 50 mM Tris-base dans l'eau bidistillée. Une quantité de protéines variant de 50 µg à 100 µg était déposée sur le gel et un temps de migration de 16 heures à 60 volts était requis pour une séparation adéquate.

4.3. Transfert des protéines sur membrane et détection de la protéine d'intérêt

Suite à l'électrophorèse, les gels de polyacrylamide étaient retirés des plaques de verre et placés pendant 30 minutes dans le tampon de transfert à 4°C (0,19 M glycine, 25 mM Tris-base dans l'eau bidistillée; un ajout de 20% méthanol était nécessaire pour les protéines ≤ 100 kDa). Une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot transfert medium, bio-rad ou Hybond-ECL, Amersham Biosciences) était utilisée pour le transfert protéique. Le transfert électrophorétique s'effectuait pour une période 30 minutes à 20 volts suivis par un temps de 1h - 1h30 à 100 volts dans un système Bio-Rad. Une fois la procédure terminée, les membranes étaient lavées à l'eau bidistillée puis colorées au rouge de ponceau

pour repérer les protéines captées sur la nitrocellulose. La décoloration des membranes s'effectuait par des lavages successifs dans le PBS. Les sites non spécifiques étaient saturés à la température de la pièce sous agitation pendant une heure dans une solution de 1%-10% de lait en poudre préparée dans le tampon PBS avec ou sans Tween 0,1% (tableau 2). Après le blocage, les membranes étaient incubées à 4°C ou température pièce avec des anticorps primaires dilués dans l'agent bloquant pendant toute la nuit sous agitation. Ensuite, des lavages au PBS-Tween 0,1% étaient effectués avant l'ajout de l'anticorps secondaire IgG anti-lapin, anti-souris ou anti-rat conjugué à la phosphatase alcaline (BioRad Laboratories) ou couplé à la peroxydase (Amersham Biosciences). L'anticorps secondaire était incubé pendant au moins une heure sous agitation à la température de la pièce. Pour la détection des antigènes via l'alcaline phosphatase, les membranes étaient lavées alternativement dans le PBS-Tween 0,1%, PBS et TBS. Les membranes étaient incubées dans le tampon ALP avant l'addition du substrat de la phosphatase alcaline (AP conjugate substrate kit, Bio-Rad). La réaction colorimétrique était arrêtée par l'immersion des membranes dans l'eau bidistillée. Pour la méthode de chemiluminescence, les membranes étaient rincées au PBS-Tween 0,1% puis au PBS. L'activité de la peroxydase était détectée avec le système ECL (Amersham Biosciences) sur des films à autoradiographie Hyper Film ECL (Amersham Bioscience).

4.4. Densitométrie des bandes immunoréactives

Afin de quantifier l'expression des protéines d'intérêts, les bandes immunoréactives étaient acquises et analysées via le logiciel Scion Image (version Beta 4.02, Scion Corporation). La quantification résultait de la normalisation des valeurs densitométriques de la protéine analysée par les valeurs obtenues pour des protéines structurales des cellules épithéliales comme l'actine.

Tableau 2. Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western

Anticorps Primaires					
Antigène	Clone Type (M/P)	Hôte	Dilution	Conditions	Références Compagnies
Intégrine α 1	FB12 (M)	S	1:500	B: Blotto 1% I: O/N T.P. R: ALP	Chemicon
Intégrine α 2	(P)	L	1:1000	B: Blotto 10% I: O/N 4°C R: ALP	Gico. Wayner et Carter, 1987
Intégrine β 1	Mab13 (M)	R	1:1000	B: Blotto 5% Tween-0.1% I: O/N 4°C R: ALP	Don de S.K. Akiyama Mould et al., 1996
β -Dystroglycan	43DAG/8D5 (M)	S	1:50	B: Blotto 5% I: O/N T.P. R: ECL	NovoCastr Laboratories
Actine	C4 (M)	S	1:10000	B: Blotto 10% Tween-0.1% I: O/N 4°C R: ECL	Chemicon
Anticorps Secondaires					
Anticorps	Conjugaison		Dilution	Compagnies	
Anit-IgG souris/lapin	Phosphatase Alcaline		1:1000	Bio-Rad	
Anti-IgG souris/lapin	Horseshadish Peroxydase		1:5000	Amersham Biosciences	
Anti-IgG rat	Phosphatase Alcaline		1:1000	Caltag Laboratories	

Légende:

Type: monoclonal (M), polyclonal (P)

Hôte: souris (S), lapin (L), rat (R)

Conditions : solution bloquante (B), temps d'incubation pour l'anticorps primaire (I) et méthode de révélation (R)

5. Extraction d'ARNs totaux

5.1. Cellules et extraction d'ARNs

Après une culture en boîte de Pétri, les cellules étaient rincées au PBS. La récupération des cellules s'effectuait par l'addition de 3 ml de TriPure Isolation Reagent (TIR; Boehringer Mannheim) par boîte de Pétri et le transfert des lysats cellulaires dans des tubes stériles. Après une incubation de 5 min à la température de la pièce, un volume de 0,2 ml de chloroforme par ml de TIR était ajouté à chaque tube. Ensuite, les lysats étaient vortexés pendant 15 secondes, incubés à sur la glace pendant 10 minutes et centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Pour chacun des tubes, la phase aqueuse était récupérée et la précipitation de l'ARN était réalisée par l'ajout de 0,5 ml d'isopropanol par ml de TIR. Les solutions aqueuses étaient ensuite mélangées par inversion, incubées pendant 10 minutes sur la glace et centrifugées 10 minutes à 10 000 rpm. Les surnageants étaient éliminés et les culots étaient lavés à l'éthanol 75% puis séchés pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les produits d'extraction étaient suspendus dans 30 ul de la solution RNasecure (Ambion) et chauffés pendant 10 minutes à 60°C. Les extraits d'ARNs totaux étaient conservés à -80°C.

5.2. Tissus et extraction d'ARNs

La préparation des ARNs totaux s'effectuait à partir de tissus préservés à -80°C. Pour procéder à l'homogénéisation, 200mg de tissus était placé dans 2 ml de solution dénaturante à 4°C (2,7 M thiocyanate de guanidine, 1,3 M thiocyanate d'ammonium, 100 mM acetate de sodium pH 4,0 ; Clontech Laboratories) et broyé sur glace à l'aide d'un Polytron (Brinkmann Instruments). L'homogénat était incubé sur glace pour une période de 10 minutes et centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après la récupération des surnageants, une extraction phénol-chloroforme était produite par l'ajout de 4 ml de phénol saturé à l'acétate de sodium 2M pH 4,0. Les tubes étaient vortexés pendant 1 minute puis incubés 5 minutes sur la glace. Ensuite, 1,2 ml de chloroforme était additionné à la solution de phénol. Le mélange phénol-chloroforme était homogénéisé et incubé 5 minutes sur la glace puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Sur la phase aqueuse obtenue, une deuxième extraction était produite avec 3,2 ml phénol saturé et 0,8 ml de chloroforme. Après cette dernière extraction, 4 ml d'isopropanol était ajouté à la phase aqueuse. Cette dernière était incubée sur la glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugée à 10 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Finalement, les culots étaient lavés à l'éthanol 80%, séchés et remis en suspension dans la solution RNasecure (Ambion). Les produits d'extractions étaient chauffés pendant 10 minutes à 60°C puis conservés à -80°C.

5.3. Réaction de transcription inverse: production d'ADNc

Pour l'obtention d'ADNc, les extraits d'ARNs totaux étaient soumis à une réaction enzymatique catalysée par la transcriptase inverse (RT; Reverse Transcriptase). Cette réaction enzymatique était produite dans une solution contenant 0.5 mM de dNTPs, 1 μ M d'amorce oligo-dT, 10 unités d'inhibiteurs de RNase, 4 unités de la transcriptase inverse (Omniscript; Quiagen) et 2 μ l de tampon 10x. Le volume était complété à 20 μ l avec de l'eau sans nucléase. Par la suite, 2 μ g d'ARNs totaux étaient ajoutés à la solution. Cette dernière était incubée à 37°C afin de permettre la transcription inverse des ARNm en ADNc. Le produit de la réaction était ensuite conservé à -20°C pour l'amplification par PCR.

5.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour l'amplification par PCR, 1 μ l de l'ADNc produite par transcription inverse était ajoutée à une solution composée de 10 μ l de tampon 10x (Qiagen), 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de chacune des amorces (tableau 3) et de 2,5 unités de l'ADN polymérase Taq (Qiagen). Le volume était complété à 50 μ l avec de l'eau traitée par DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) pour neutraliser les ARNases protégeant ainsi l'ARN de la dégradation. Un protocole de Touchdown PCR (Don et al. 1991) était utilisé pour amplifier des segments d'ADNc. La procédure consistait en une dénaturation (94°C, 1 minute), suivie d'une hybridation (2

minutes) et d'une extension (72°C, 1 minute). Pour débiter, la température d'hybridation était réglée à 65°C et, à tous les deux cycles, elle était réduite d'un degré. La réaction de polymérisation en chaîne était poursuivie jusqu'à l'atteinte d'une température d'hybridation minimale de 50°C. Cette réaction était terminée par une extension de 13 minutes à 72°C. L'ADNc était amplifié par un nombre de cycles variant de 20 à 32 dépendant de l'ARNm analysé. Les produits PCR étaient séparés sur gel d'agarose 1,5% dans le tampon TAE 1X (0.04 M tris-acétate, 0.0001 M EDTA) et visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

5.5. RT-PCR quantitatif (PCR en temps réel)

La procédure de RT-PCR quantitatif était réalisée avec un système en temps réel (Mx3000P, Stratagene). Chaque réaction PCR était composée de 1µl de ADNc, 0,15 µM de chacune des amorces, 0,3X SYBR Green I, 0,8 mM de dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U *SureTaq* DNA polymérase et du tampon 1X (Brillant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit, Stratagene). Pour la détection des amplicons, le colorant fluorescent SYBR Green était utilisé. Cette coloration était hautement spécifique pour l'ADN double-brin permettant de mesurer l'accumulation des produits à chaque cycle (Simpson et al., 2000). Après une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 minutes, les réactions de RT-PCR étaient suivies par 40 cycles (dénaturation à 94°C pour 30 secondes, hybridation à 57°C pour 60 secondes et élongation à 72°C secondes). Pour vérifier la spécificité des

produits, l'analyse du point de dissociation des double-brins d'ADN était réalisée. Après le dernier cycle d'amplification, les échantillons étaient refroidis à 57°C. Par la suite, la température était augmentée de 0,2°C/seconde jusqu'à une valeur maximale de 95°C. Pour chaque gène cible, un seul produit d'amplification était décelé à une température de dissociation spécifique. La spécificité de l'amplification était aussi confirmée par l'électrophorèse du produit de RT-PCR sur gel d'agarose. La quantification des échantillons était accomplie par l'évaluation du CT (threshold cycle) en utilisant la courbe standard réalisée avec l'ARN total de cellules HIEC-6 non-traitées (dilution 10X, 100X et 1000X). Tous les échantillons étaient analysés en duplicata et les expériences étaient exécutées à trois reprises. Les résultats étaient exprimés en utilisant des unités arbitraires après une correction par les efficacités d'amplification pour chacun des gènes et une normalisation par S14 pour chacun des échantillons.

**Tableau 3. Séquences d'amorces utilisées pour les expériences de
RT-PCR et RT-PCR quantitatif**

ARNm cible	Amorce en 5'	Amorce en 3'	Séquence ADNc
Intégrine α 1	catcaggtgggatggtaag	tggctcaaaattcatggtca	NCBI XM_032902
Intégrine α 2	cagctgcagaaatcaacacc	tctcatctggatttttggca	NCBI AF512556
Intégrine α 3	ctcatgcctttgaggtcat	agaagcttttagccggtga	NCBI NM_002204 (variant a)
Intégrine α 6	ttatcggctcgggagttg	ggccactgaatgttcaaggt	NCBI NM_000210
Intégrine β 1	tgtgagtgaacccaacta	gggtaatttgtcccgactt	NCBI NM_002211
Dystroglycan	gactgggaaaaccagcttga	agggtgtggctctgtgagtc	NCBI L19711

6. Test d'adhésion cellulaire

6.1. Préparation des plaques

L'adhésion des cellules HIEC-6 sur différentes matrices était effectuée dans des plaques de 96 puits (Starstedt), selon un protocole modifié de Niessen et al. en 1994. Dans un premier temps, les matrices étaient diluées à différentes concentrations dans le PBS (tableau 4) et déposées dans les puits (200 µl/puits). L'adsorption des protéines matricielles était effectuée pendant toute une nuit à 4°C. Le lendemain, les puits étaient rincés au PBS et une solution bloquante de 2% BSA était ajoutée (200 µl/puits). La plaque était incubée au moins deux heures à 37°C. Après la saturation des sites non spécifiques, les puits étaient rincés à nouveau au PBS et 100 µl de milieu Opti MEM I 0,5% BSA supplémenté avec 0,3 mM MnCl₂ était déposé dans chaque puits. Pour les analyses fonctionnelles du dystroglycan, 1 mM de CaCl₂ était ajouté au milieu d'adhésion en plus du MnCl₂.

Tableau 4. Matrices utilisées pour les tests d'adhésion cellulaire

Matrices	Concentration	Quantité par puits	Compagnies
Collagène type I	50 µg/ml	5 ug	BD Biosciences
Laminine-1	5µg/ml	1 ug	Gibco BRL
Laminine-2	5µg/ml	1 ug	Chemicon

6.2. Récupération et ensemencement des cellules

Les cellules cultivées en boîte de Pétri étaient rincées au PBS et incubées pendant une période de 15 minutes dans 1 ml de PBS-EDTA 0,5mM afin d'inhiber les interactions cellules-matrices. Pour augmenter le rendement de cellules récupérées, quelques gouttes de trypsine-EDTA étaient ajoutées à chaque boîte de Pétri. Après quelques secondes, un volume égal d'inhibiteur (TNS, Cambrex Bio Science) était utilisé pour neutraliser la réaction enzymatique. Les cellules étaient diluées dans 10 ml de milieu Opti MEM I 0,5% BSA (supplémenté en Mn^{2+} ou Mn^{2+}/Ca^{2+}), placées dans un tube falcon et centrifugées à 800 rpm pendant 4 minutes dans une centrifugeuse IEC PR-J. Le culot cellulaire était ensuite remis en suspension dans du milieu d'adhésion afin d'obtenir 500 000 cellules/ml. Les cellules étaient conservées dans cet état d'homogénéité pour un temps fixe de 60 minutes. Pour les tests d'inhibition d'adhésion, les cellules étaient incubées en présence d'anticorps neutralisants dans les 30 dernières minutes de cette période. Par la suite, 50 000 cellules étaient ensemencées dans chaque puits et les plaques étaient transférées à 37°C dans un incubateur à 5% CO₂ pour une durée de 30 minutes.

Tableau 5. Anticorps neutralisants et agent pharmacologique utilisés pour les tests d'inhibition d'adhésion cellulaire.

Anticorps neutralisants				
Antigène	Clone (M/P)	Hôte	Concentration	Référence Compagnie
Intégrine α 1	FB12 (M)	S	10 μ g/ml	Chemicon
Intégrine α 2	P1E6 (M)	S	10 μ g/ml	Chemicon
Intégrine α 3	P1B5 (M)	S	10 μ g/ml	Chemicon
Intégrine α 6	GOH3 (M)	R	10 μ g/ml	Santa Cruz
Intégrine β 1	Mab13 (M)	R	10 μ g/ml	Mould et al. 1996
IgG de souris	-----	S	10 μ g/ml	Sigma
Inhibiteur pharmacologique				
Agent inhibiteur		Concentration		Compagnie
Héparine		1mg/ml		Leo Pharma Inc.

Légende:

Type: monoclonal (M)

Hôte: souris (S) et rat (R)

6.3. Quantification de l'adhésion cellulaire

Suite aux 30 minutes d'incubation à 37°C, les plaques étaient immergées dans du PBS à la température de la pièce. L'excès de PBS était enlevé par aspiration en laissant 100 µl dans le fond de chaque puits et 100 µl de formaldéhyde 7,4% (pH 7,4) était ajouté. Le temps de fixation était de 25 minutes à la température de la pièce. Les cellules étaient ensuite lavées au PBS par immersion. Pour la quantification colorimétrique, 50 µl de cristal violet 1% dans du méthanol était placé dans les puits et incubé pendant 10 minutes sous agitation. La plaque était ensuite lavée dans un bain d'eau et l'excès de colorant était enlevé par un lavage au PBS. Le liquide était aspiré des puits et 200 µl de SDS 2% dans du PBS était ajouté pour solubiliser la coloration. Le nombre de cellules était quantifié selon la densité optique de la solution à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (modèle 3550, BIO-RAD).

7. Tests statistiques

Les données obtenues étaient exprimées selon la moyenne \pm l'erreur standard (ES) d'au moins trois expériences distinctes. Afin d'évaluer l'égalité entre les moyennes, le test d'ANOVA (ANalysis Of Variance between groups) One-way était utilisé pour une analyse comparative impliquant plus de deux groupes. Lorsque l'hypothèse nulle était rejetée, l'analyse statistique était poursuivie en utilisant les tests post hoc de Bonferroni ou de Tukey pour procéder aux comparaisons multiples, dans un intervalle de confiance $p \leq 0,05$. Le test de Student était substitué au test d'ANOVA pour une analyse comportant seulement deux groupes. Les logiciels statistiques utilisés pour cette étude étaient Statistix 7.0 , StaTable 1.01. et Prism 3.0.

III - RÉSULTATS

1. Analyse des intégrines cryptales associées aux interactions cellules-laminines dans la muqueuse intestinale humaine

1.1. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans la muqueuse intestinale

Dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte, la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines a été observée dans la région des cryptes (Beaulieu, 1992). Suite à cette étude, une analyse du patron d'expression de cette protéine a été effectuée au cours de la morphogenèse. Des immunofluorescences indirectes ont été produites sur des spécimens d'intestin grêle foetal de 10 à 20 semaines ainsi que sur des tissus adultes (figure 7). Tout d'abord, l'analyse révèle l'absence de la sous-unité $\alpha 1$ de la muqueuse intestinale à la 10^e semaine de vie foetale (figure 7A). Sa présence se manifeste faiblement dans l'espace intervillitaire et les cellules musculaires du mésenchyme vers la 14^e semaine, période précédant la formation des cryptes (figure 7B). À la 18^e et 20^e semaines, l'expression épithéliale est culminante et confinée à la moitié inférieure du compartiment cryptal (figure 7C,D). La détection de la sous-unité $\alpha 1$ se caractérise alors par un marquage basolatéral régulier et défini à la membrane des cellules. Dans les spécimens adultes, l'expression épithéliale est maintenue (figure 7E). De plus, l'immunolocalisation met en évidence un marquage soutenu associé aux cellules musculaires et aux couches de muscles lisses (figure 7D,E).

Par RT-PCR, la présence du transcrite de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines a été détectée dans les trois fractions tissulaires (muscle lisse, mésenchyme et épithélium) de spécimens d'intestin grêle foetal âgé entre 17 et 20 semaines (figure 8A). La forte expression du messenger dans le muscle lisse et le mésenchyme corrèle parfaitement avec les observations réalisées lors des analyses histologiques. Dans les lignées cellulaires épithéliales, les quantités relatives du transcrite sont élevées pour les cellules HIEC-6 et plus faibles pour les cellules Caco-2/15, même à sous-confluence. Au cours du processus de différenciation, dans les cellules Caco-2/15, l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ chute au 5^e jour de post-confluence.

L'analyse protéique des cellules HIEC-6 et Caco-2/15 révèle un patron d'expression semblable à celui obtenu pour l'ARN messenger (figure 8B). En effet, les quantités relatives de la sous-unité $\alpha 1$ dans les cellules HIEC-6 sont plus importantes que dans les cellules Caco-2/15. De plus, les variations protéiques dans les cellules Caco-2/15 sont également associées à la différenciation cellulaire avec une expression à la limite de la détection au 15^e jour de post-confluence.

Figure 7. Expression et localisation de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines au cours de la morphogenèse de l'intestin grêle humain

Micrographies d'immunofluorescences indirectes de champs représentatifs d'iléon à 10 (A), 14 (B), 18 (C) et 20 (D) semaines de gestation et adulte (E) incubé en présence d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines.

Au début du développement, la sous-unité $\alpha 1$ est absente (A). À la 14^e semaine, l'apparition d'un faible marquage est observé dans l'épithélium (e) intervillitaire (B). À 18 (C) et 20 (D) semaines, la détection est maximale et restreinte à l'épithélium cryptal ainsi qu'aux cellules musculaires du mésenchyme (m). Chez l'adulte, l'expression de la sous-unité est conservée. Les barres représentent une mesure de 25 μm .

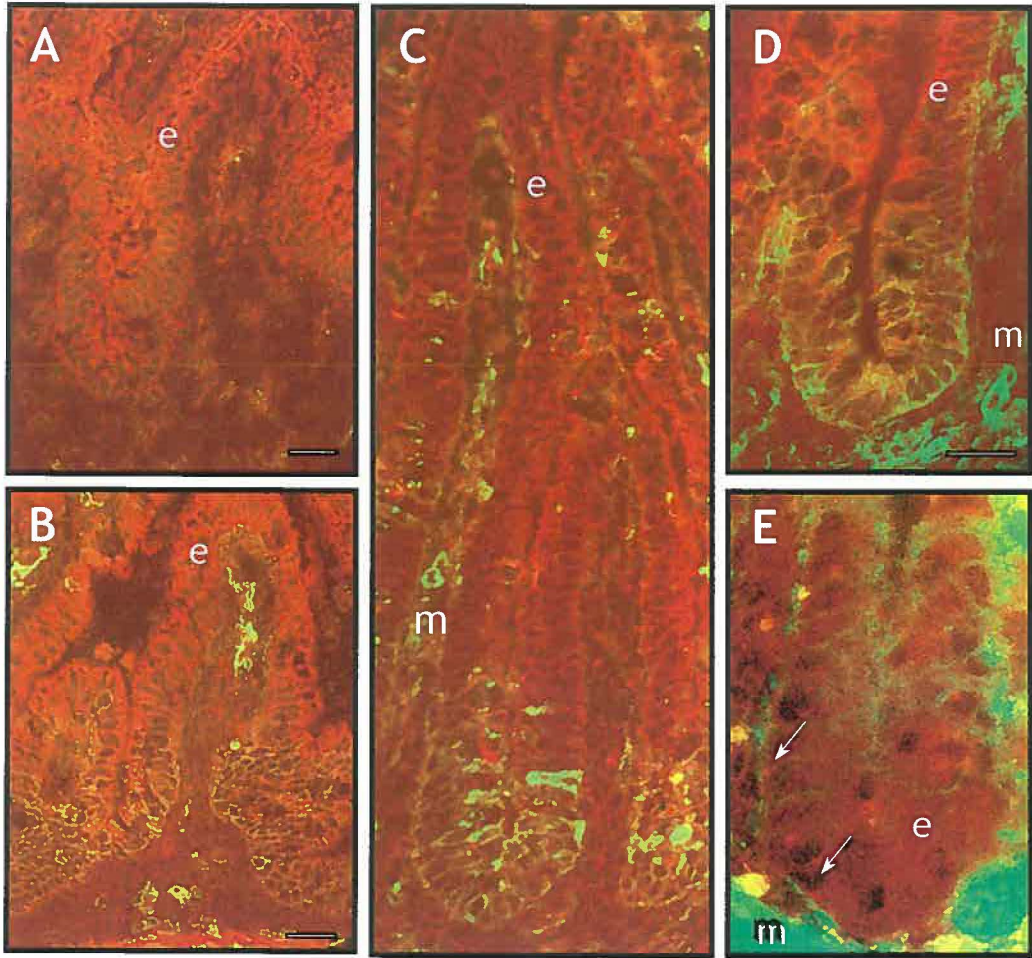
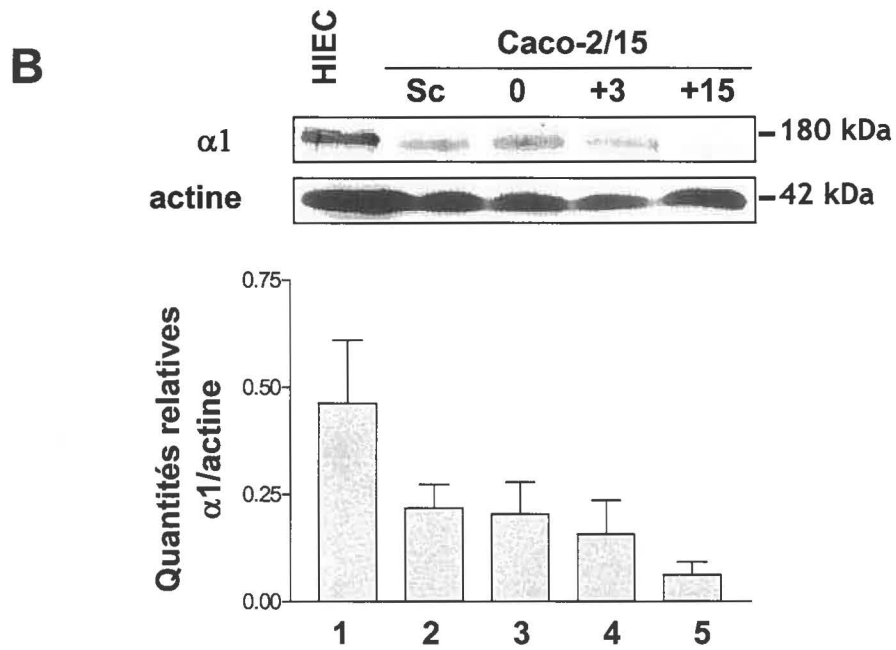
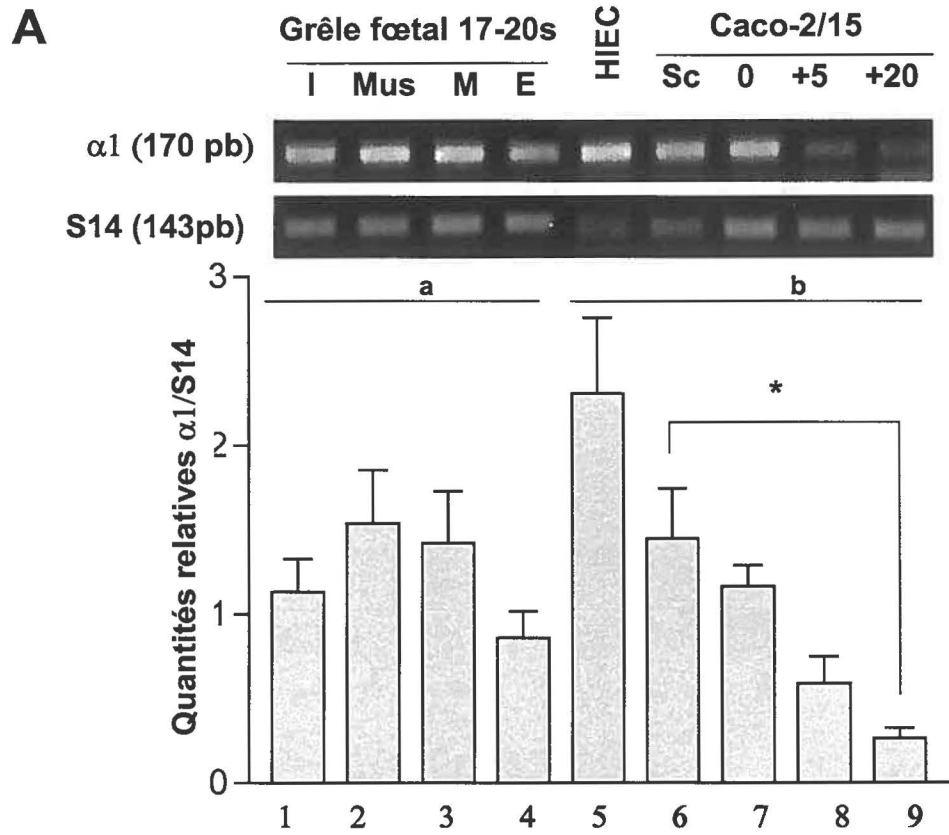


Figure 8. Expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines dans l'intestin grêle foetal et les lignées cellulaires intestinales humaines.

A. RT-PCR représentatif du transcrite de la sous-unité $\alpha 1$ dans l'intestin grêle foetal intact (1), les fractions tissulaires de muscle lisse (2), de mésenchyme (3) et d'épithélium (4) ainsi que dans les lignées cellulaires HIEC-6 (5) et Caco-2/15 à différentes confluences cellulaires (6-9). Deux analyses statistiques ont été effectuées sur ces échantillons afin de révéler les différences quantitatives de messenger pour les fractions tissulaires (a) et, les modèles cellulaires HIEC-6 et Caco2/15 (b).

B. Immunobuvardage de type Western d'extraits protéiques totaux de cellules HIEC-6 (1) et Caco-2/15 au cours du processus de différenciation (2-5) pour l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines (180 kDa). Les protéines (100 μ g/puits) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices.

Les quantités relatives d'ARNm et de protéines pour la sous-unité $\alpha 1$ ont été déterminées par rapport à l'expression du transcrite S14 et de la protéine d'actine respectivement (n = 3). Les différences statistiques entre les quantités relatives de messenger pour les Caco-2/15 à sous-confluence et Caco-2/15 à 20 jours de post-confluence ont été notées (* p < 0,02 ANOVA et test de comparaison Bonferroni)



1.2. La sous-unité $\alpha 2$ des intégrines est présente dans l'épithélium intestinal

Des études antérieures ont démontré que l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ était détectée au cours du développement, dans l'épithélium de l'intestin grêle humain (Perreault et al. 1995; Beaulieu, 1992). Afin de consolider ces observations, des analyses par immunofluorescence indirecte ont été reproduites en utilisant des conditions expérimentales différentes (spécimens, agent bloquant et concentration d'anticorps). Dans un premier temps, les micrographies arborent une distribution comparable à la caractérisation initiale de la sous-unité $\alpha 2$ (figure 9A, B, C). En effet, la protéine se retrouve majoritairement dans la région intervillositaire et cryptale de l'épithélium. De même, l'expression se restreint au domaine basolatéral des cellules épithéliales.

L'étude des transcrits, par RT-PCR, a permis de déceler une présence importante de la sous-unité $\alpha 2$ dans la fraction épithéliale (figure 9D). En culture *in vitro*, les résultats démontrent qu'il y a des quantités relatives considérables de cette sous-unité dans les cellules HIEC-6. Pour les cellules Caco-2/15, l'expression du gène est plus faible et ne semble pas varier au cours de la différenciation cellulaire.

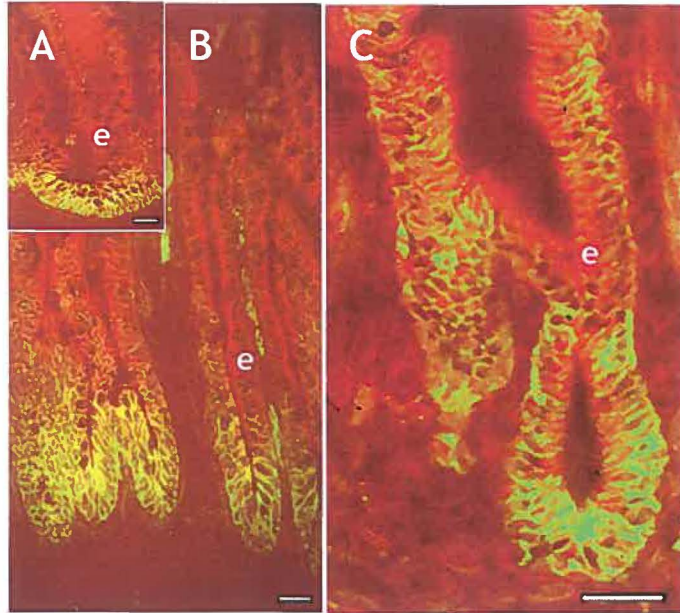
Par analyse de type Western, l'expression protéique de la sous-unité $\alpha 2$ a été caractérisée dans les lignées cellulaires HIEC-6 et Caco-2/15 (figure 9E). Dans un premier temps, l'immunodétection confirme une présence importante de cette sous-unité dans les cellules HIEC-6. Par contre, dans le modèle cellulaire Caco-2/15, l'expression est plus faible et semble s'atténuer légèrement avec la confluence cellulaire comparativement à l'ARN messager.

Figure 9. Localisation et expression de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines au cours de la morphogénèse de l'intestin grêle humain ainsi que dans les tissus foetaux et les lignées cellulaires intestinales.

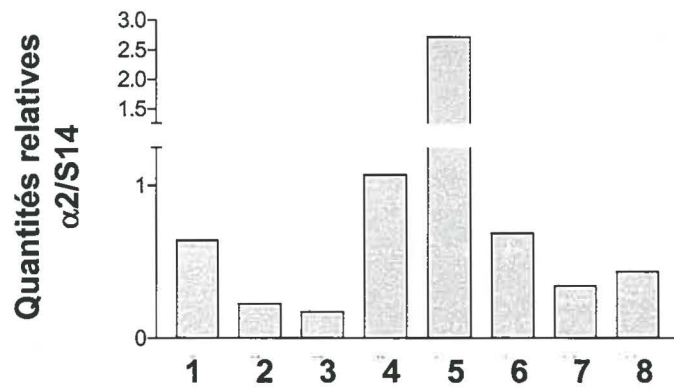
Micrographies d'immunofluorescences indirectes d'iléon foetal à 12 (A) et 18 (B) semaines ainsi qu'au stade adulte (C) incubé en présence d'un anticorps spécifique dirigé contre la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines. Dès la 10^e semaine, une forte expression est observée dans l'épithélium (e) de l'espace intervillósitaire (A). À la 18^e semaines, la détection est maximale et restreinte à l'épithélium de la crypte (B). Cette distribution est maintenue dans l'intestin grêle adulte (C).

D. RT-PCR représentatif de l'ARNm de la sous-unité $\alpha 2$ dans l'intestin grêle foetal intact (1), les fractions tissulaires de muscle lisse (2), de mésenchyme (3) et d'épithélium (4) ainsi que dans les lignées cellulaires HIEC-6 (5) et Caco-2/15 à différentes confluences cellulaires (6-8). Les quantités relatives d'ARNm, pour ce RT-PCR, ont été déterminées par rapport à l'expression du transcrit S14.

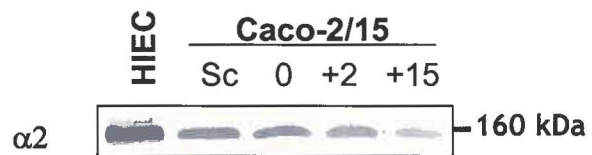
E. Immunobuvardage de type Western d'extraits protéiques totaux de cellules HIEC-6 (1) et Caco-2/15 au cours du processus de différenciation (2-5) pour l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines (160 kDa). Les protéines (100 μ g/puits) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices.



D



E



2. Effet de régulateurs du développement intestinal, glucocorticoïdes et EGF, sur l'expression des intégrines et la morphologie cellulaire

2.1. Modulation de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines en culture organotypique

Les analyses précédentes d'immunolocalisation pour la sous-unité $\alpha 1$ ont démontré que cette protéine apparaissait tardivement au cours du développement foetal de l'intestin grêle humain. De plus, il est maintenant établi que les régulateurs morphogéniques (hormones et facteurs de croissances) peuvent agir sur l'expression protéique et l'activité enzymatique (Arsenault et Ménard, 1985; Basson et al., 1992; Simon-Assmann et al., 1995). Suite à ces observations, l'action des glucocorticoïdes et de l'EGF, deux régulateurs importants, a été étudiée au niveau de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines par immunofluorescence indirecte, en utilisant des explants d'intestin grêle foetal âgé entre 17-20 semaines (figure 10). Les spécimens ont été exposés à des concentrations fixes d'EGF et de dexaméthasone, un analogue pharmacologique du cortisol, pour une période variant entre 48 et 72 heures. Dans un premier temps, l'analyse de la sous-unité $\alpha 2$, sous les quatre conditions de culture, permet de souligner l'influence de l'EGF sur l'expression de la protéine. Dès les premières 48 heures, l'addition d'EGF augmente fortement la présence épithéliale de la sous-unité $\alpha 2$ comparativement au contrôle (figure 10A, B). Lorsque combiné à la

dexaméthasone, l'EGF contribue à une hausse partielle de l'expression protéique puisque la dexaméthasone seule n'a aucun effet (figure 10C-D). Pour la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines, les modulations d'expression dans l'épithélium sont difficilement perceptibles, même après 72h en culture, par la présence d'un grand nombre de cellules musculaires dans le mésenchyme (figure 10E-H). Les expériences n'ont donc pas été concluantes pour cette sous-unité.

2.2. Variations quantitatives des intégrines cryptales dans les cellules HIEC-6

Les résultats obtenus en culture organotypique ont permis d'exposer l'action de l'EGF et possiblement des glucocorticoïdes sur l'expression des intégrines. Suite à ces conclusions, les analyses ont été poursuivies dans le modèle cellulaire HIEC-6. Les cellules ont été traitées pendant 72 heures à des concentrations fixes d'EGF et/ou de dexaméthasone. Dans un premier temps, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$ des intégrines ont été évaluées pour leur expression protéique dans ces cellules. Pour la sous-unité $\alpha 1$, l'analyse démontre une double réponse aux traitements (figure 11A). Les cellules HIEC-6 réagissent à l'EGF en diminuant de 65% l'expression de cette protéine et à la dexaméthasone en l'augmentant de 111%. En présence des deux régulateurs, l'effet positif de la dexaméthasone est presque entièrement neutralisé par l'EGF, ramenant l'expression protéique comparable à celle du contrôle. Contrairement à la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines, l'ajout d'EGF au milieu de culture accroît

significativement de 138% la présence de la sous-unité $\alpha 2$ (figure 11B). De plus, l'effet de l'EGF n'est en aucun cas perturbé par une interaction avec la dexaméthasone. Enfin, l'analyse de la sous-unité $\beta 1$, pouvant s'hétérodimériser avec $\alpha 1$ et $\alpha 2$, révèle l'absence de modulation protéique par les divers traitements (figure 11C).

Par RT-PCR quantitatif, l'action de l'EGF et des glucocorticoïdes a été étudiée au niveau des ARNm des intégrines (figure 12). Tout comme pour l'analyse protéique, l'EGF diminue significativement la présence des messagers de la sous-unité $\alpha 1$ et augmente celle de la sous-unité $\alpha 2$. L'addition de dexaméthasone induit également des changements spécifiques à la sous-unité $\alpha 1$ par une hausse importante des transcrits. Pour la sous-unité $\beta 1$, les quantités relatives des ARNm des cellules traitées restent comparables à celles du contrôle. Cette analyse a aussi été produite sur deux autres sous-unités α connues pour lier les laminines, soit les intégrines $\alpha 3$ et $\alpha 6$. Les résultats démontrent que la dexaméthasone peut également moduler de façon négative l'expression de la sous-unité $\alpha 6$.

2.3. Observation de différences morphologiques pour les cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF

Des distinctions morphologiques importantes chez les cellules HIEC-6 ont été remarquées suite à l'addition de concentrations fixes d'EGF et/ou de dexaméthasone au milieu de culture (figure 13). Premièrement, les micrographies en contraste de phase témoignent de l'effet du facteur de croissance EGF sur l'aspect physique des cellules. Ces dernières adoptent des configurations plus allongées et leur cytoplasme est plus dense comparativement au contrôle (figure 13B, D). L'action des glucocorticoïdes est tout autre sur la morphologie des HIEC-6. En présence de cette hormone, les cellules s'étalent de façon très importante laissant des contours cytoplasmiques quasi imperceptibles et un noyau central occupant une surface restreinte (figure 13C).

Figure 10. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines en culture organotypique

Micrographies d'immunofluorescences indirectes représentatives d'explants d'intestin grêle fœtal (17 à 20 semaines) sans traitement (A,E), exposés à 100ng/ml d'EGF (B,F), 1 μ M de dexaméthasone (C,G) et la combinaison dexaméthasone/EGF (D,H). Les spécimens ont été marqués avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés spécifiquement contre les sous-unités $\alpha 1$ (E-H) et $\alpha 2$ des intégrines (A-D).

Après 48 heures en culture, l'expression épithéliale de la sous-unité $\alpha 2$ est augmentée en présence d'EGF (B,E) par rapport au contrôle (A). Aucune modulation n'est observée dans les explants traités à la dexaméthasone (C). Pour la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines, une absence de réponse significative suite aux différents traitements a été notée, même après 72 heures en culture (E-H).

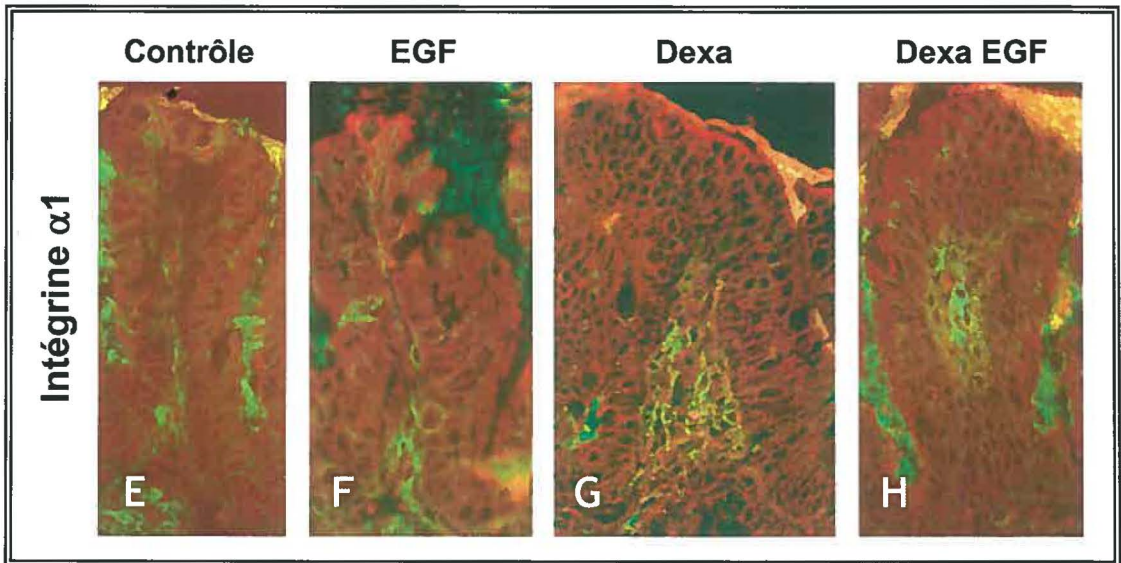
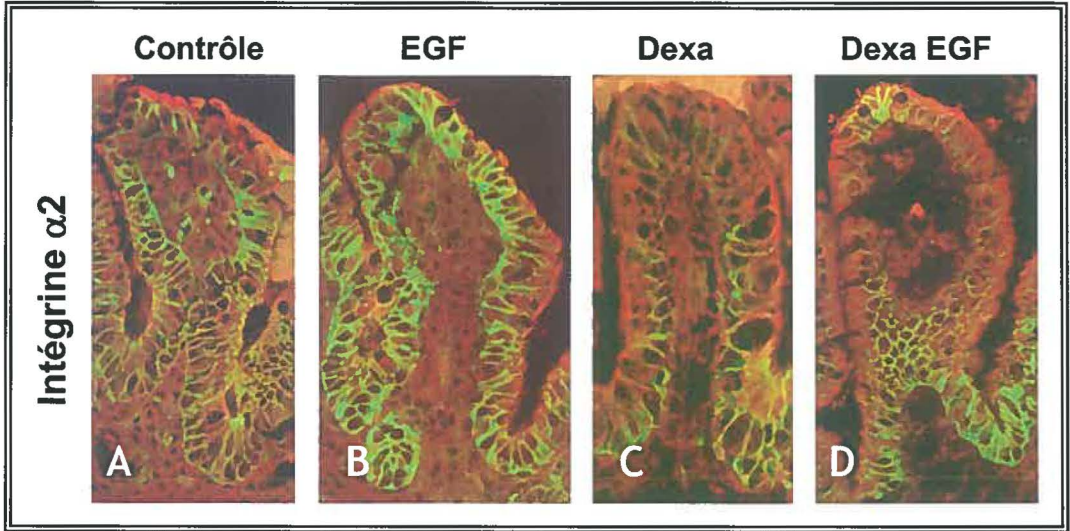


Figure 11. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression protéique des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$ des intégrines dans les cellules HIEC-6

Analyse Western représentative pour l'expression d'intégrines dans les cellules HIEC-6 sans traitement (1) et traitées pendant 72 heures avec 20ng/ml d'EGF (2,4) et/ou 0,1 μ M de dexaméthasone (3,4). La détection des sous-unités $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B) et $\beta 1$ (C) a été effectuée par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Les protéines (100 μ g/puits) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices.

Les quantités relatives ont été déterminées par rapport à l'expression protéique de l'actine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. Les différences statistiques entre les quantités relatives de protéines ont été notées pour les sous-unités $\alpha 1$ (* $p < 0,03$ ANOVA et test de comparaison Turkey) et $\alpha 2$ (** $p < 0,008$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni).

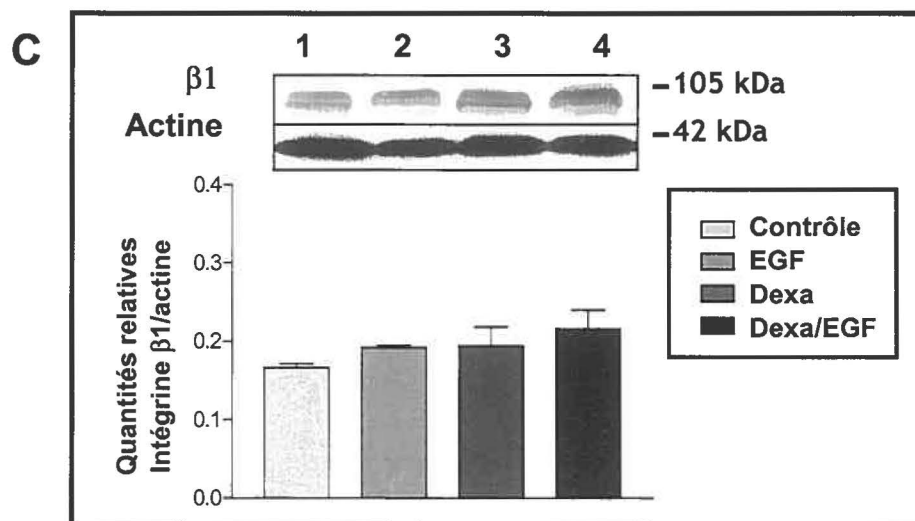
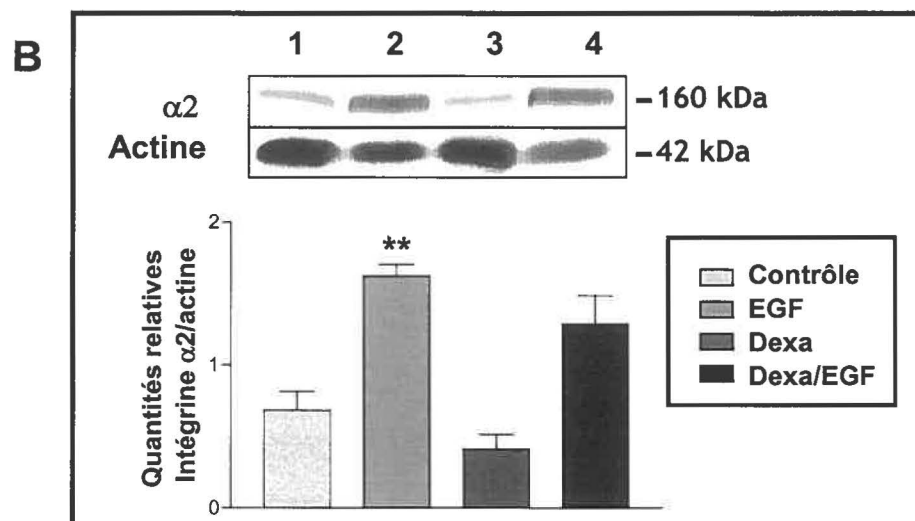
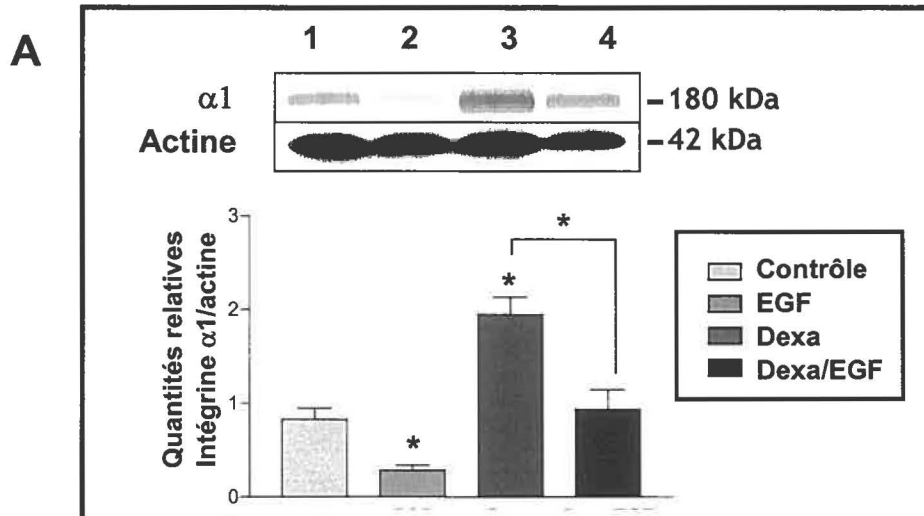


Figure 12. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur l'expression de l'ARNm des sous-unités α et β des intégrines dans les cellules HIEC-6

Analyse par RT-PCR quantitatif de l'ARNm des sous-unités α_1 , α_2 , α_3 , α_6 et β_1 des intégrines dans les cellules HIEC-6 sans traitement et traitées pendant 72 heures avec 20ng/ml d'EGF et/ou 0,1 μ M de dexaméthasone.

Les résultats ont été exprimés en fonction du calibrateur (cellules non traitées) après correction par l'efficacité d'amplification pour chacun des gènes et normalisation par l'expression du transcrite S14 pour chaque échantillon. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes en duplicata. Des différences statistiques entre les quantités relatives de messagers ont été relevées pour les sous-unités α_1 (* $p < 0,0002$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni), α_2 (* $p < 0,0001$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni) et α_6 (* $p < 0,007$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni).

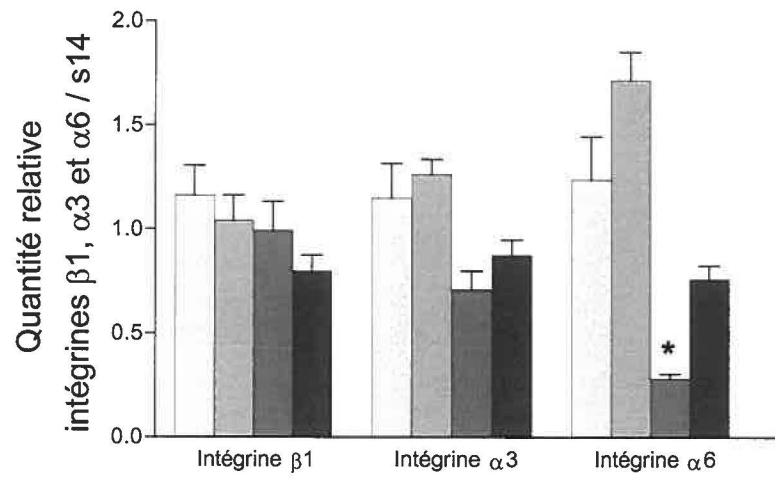
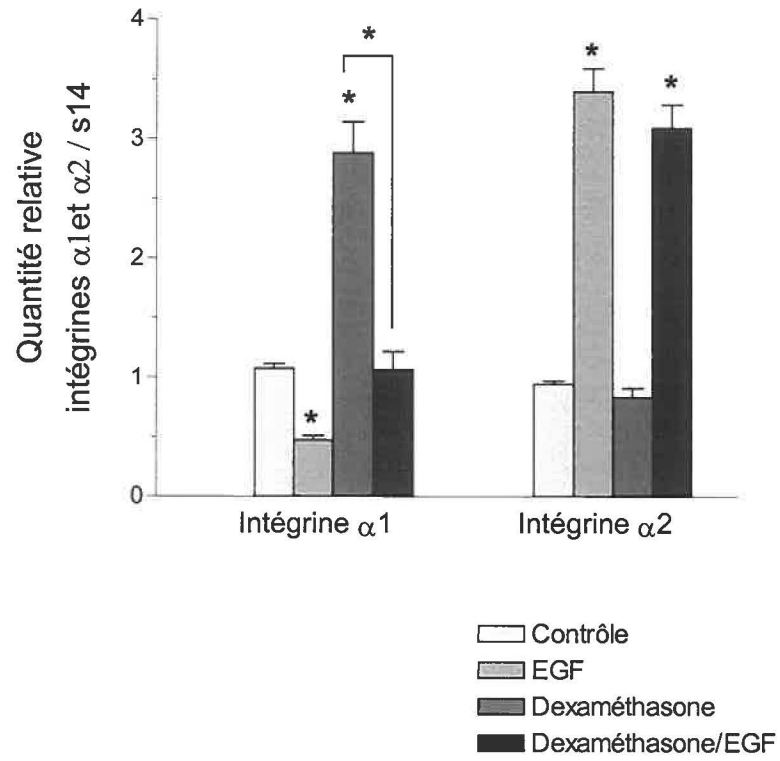
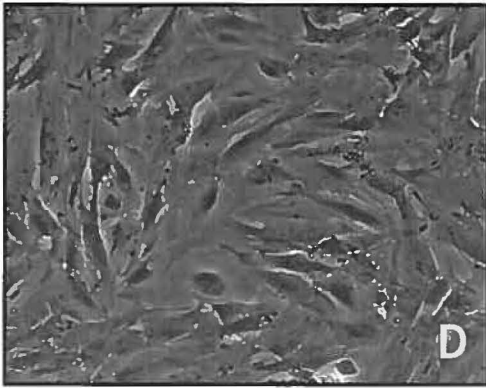
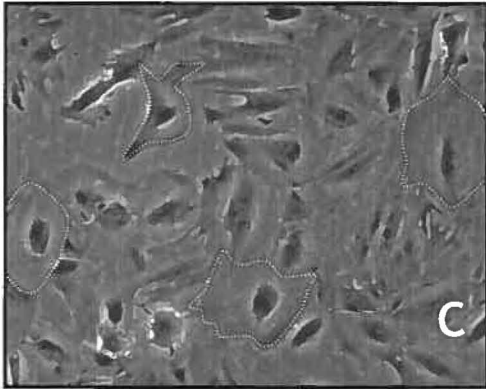
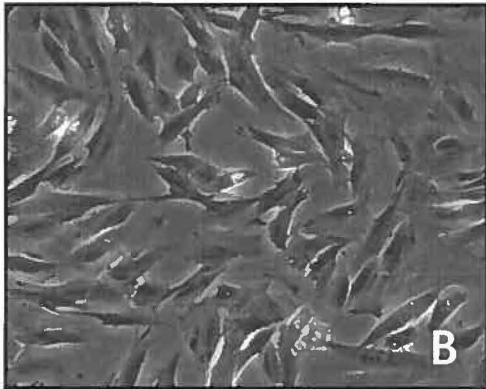
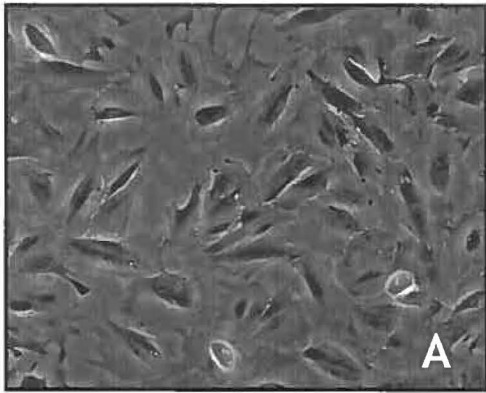


Figure 13. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur la morphologie des cellules HIEC-6

Micrographies à contraste de phase représentatives des cellules HIEC-6 cultivées sur plastique après 72 heures sans traitement (A), incubées en présence de 20ng/ml d'EGF (B), 0,1 μ M de dexaméthasone (C) et la combinaison EGF/dexaméthasone (D). (n \geq 4)

Des différences morphologiques significatives sont observées pour le modèle cellulaire HIEC-6, en réponse aux traitements. En effet, les cellules traitées à l'EGF adoptent une forme plus allongée et leur cytoplasme est plus dense que les cellules contrôles (A,B). La dexaméthasone, pour sa part, favorise l'étalement maximal des cellules (C). La combinaison EGF/dexaméthasone semble provoquer une réponse intermédiaire à celles produites par le facteur de croissance et l'hormone individuellement (D). Les lignes pointillées délimitent le contour cytoplasmique des cellules.



3. Modification du potentiel adhésif des cellules HIEC-6 en présence d'EGF et/ou de glucocorticoïdes

3.1. Adhésion court terme des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF sur les laminines-1/2.

Les résultats précédents ont démontré que la présence de facteur de croissance épidermique et de glucocorticoïdes pouvaient moduler l'expression de certaines intégrines cryptales et modifier l'apparence morphologique des cellules HIEC-6. Ces deux observations étant étroitement reliées à l'adhésion cellulaire, les analyses ont été poursuivies afin de caractériser le potentiel adhésif des cellules traitées sur les laminines-1 et 2 (figure 14). Tout d'abord, les résultats des tests d'adhésion à court terme démontrent que la dexaméthasone seule ou en présence d'EGF augmente le nombre de cellules adhérees de 48% et 75% respectivement, sur la laminine-1. De plus, l'ajout d'EGF au milieu de culture ne modifie d'aucune façon le mode adhésif des cellules à la laminine-1 comparativement aux cellules non traitées. Dans un deuxième temps, l'analyse révèle que la présence d'EGF diminue de 33% l'adhésion des cellules HIEC-6 à la laminine-2. Au contraire, le nombre de cellules adhérees sur la laminine-2 augmente en présence de dexaméthasone. L'effet répressur de l'EGF n'est pas noté lorsqu'il est combiné aux glucocorticoïdes relevant ainsi un phénomène de dominance d'action.

Ces observations renforcent les concordances entre une modulation différentielle de l'expression des récepteurs de type intégrine et une modification du potentiel adhésif cellulaire suivant un traitement à l'EGF et/ou aux glucocorticoïdes.

3.2. Adhésion long terme des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes et/ou à l'EGF sur les laminines-1/2.

Les analyses du potentiel adhésif des cellules HIEC-6 à court terme ont permis de montrer que l'EGF et les glucocorticoïdes pouvaient affecter l'affinité de ces cellules pour des isoformes spécifiques de laminine. Afin de caractériser davantage ce phénomène, des essais d'adhésion à plus long terme ont été produits sur les laminines-1 et 2 (figure 15). La morphologie et l'adhésion cellulaire ont été analysées par microscopie à contraste de phase suivie par une quantification colorimétrique. Les micrographies exposent trois grandes tendances. Premièrement, les cellules adhèrent plus fortement à la laminine-1 qu'à la laminine-2, tous traitements confondus. Dans un second temps, l'adhésion des cellules traitées à l'EGF est plus faible comparativement au contrôle, peu importe l'isoforme de laminine étudiée. Dans ces conditions, un grand nombre de cellules adoptent une morphologie plus ronde. L'apparition de cloques membranaires animées (blebbing membranaire) sur les cellules s'est manifestée plus particulièrement dans les puits contenant la laminine-2.

Pour terminer, les cellules traitées à la dexaméthasone adhèrent plus solidement aux matrices. De plus, ce glucocorticoïde cause un impact important sur l'aspect morphologique des cellules HIEC-6. L'augmentation considérable de l'étalement cellulaire, préalablement observée, est aussi présente lorsque les cellules sont en contact avec les laminines-1 et 2.

Figure 14. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur le potentiel adhésif à court terme des cellules HIEC-6

Les cellules HIEC-6, préalablement traitées pendant 72 heures avec 20ng/ml d'EGF et/ou 0,1 μ M de dexaméthasone, ont étéensemencées dans des puits contenant les laminines-1 ou 2 à une concentration de 5 μ g/ml. L'incubation cellule-matrice a été effectuée à 37°C pour une période de 30 minutes. Le nombre de cellules adhérees a été déterminé par une courbe standard sur le collagène de type I. L'adhésion non spécifique a été quantifiée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences indépendantes en triplicata. Des différences statistiques entre le nombre de cellules adhérees suite aux traitements à la dexaméthasone et/ou EGF ont été décelées pour les laminine-1 et 2 (* p < 0,003; ** p < 0,0005; *** p < 0,0001 ANOVA et test de comparaison Bonferroni).

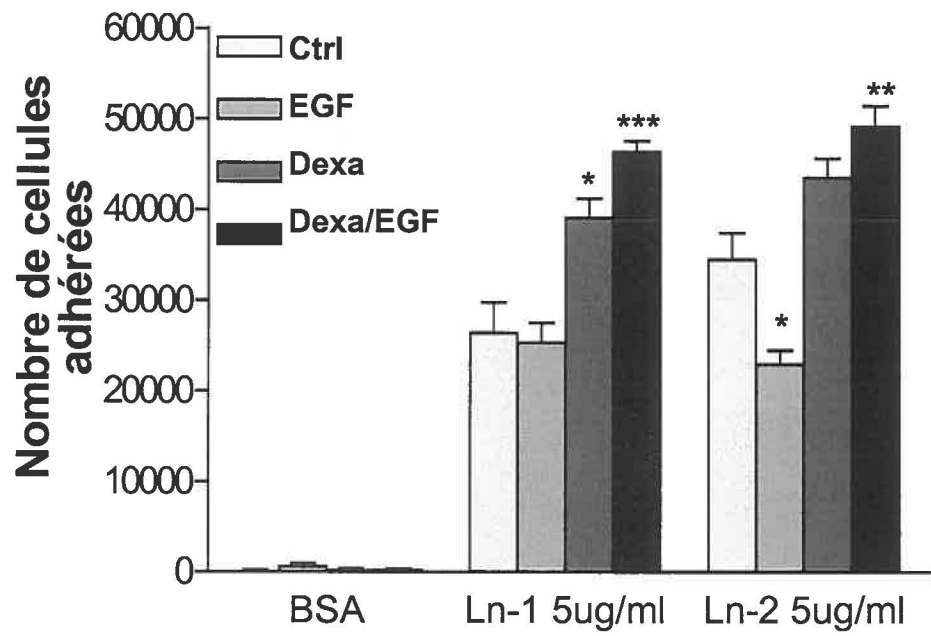


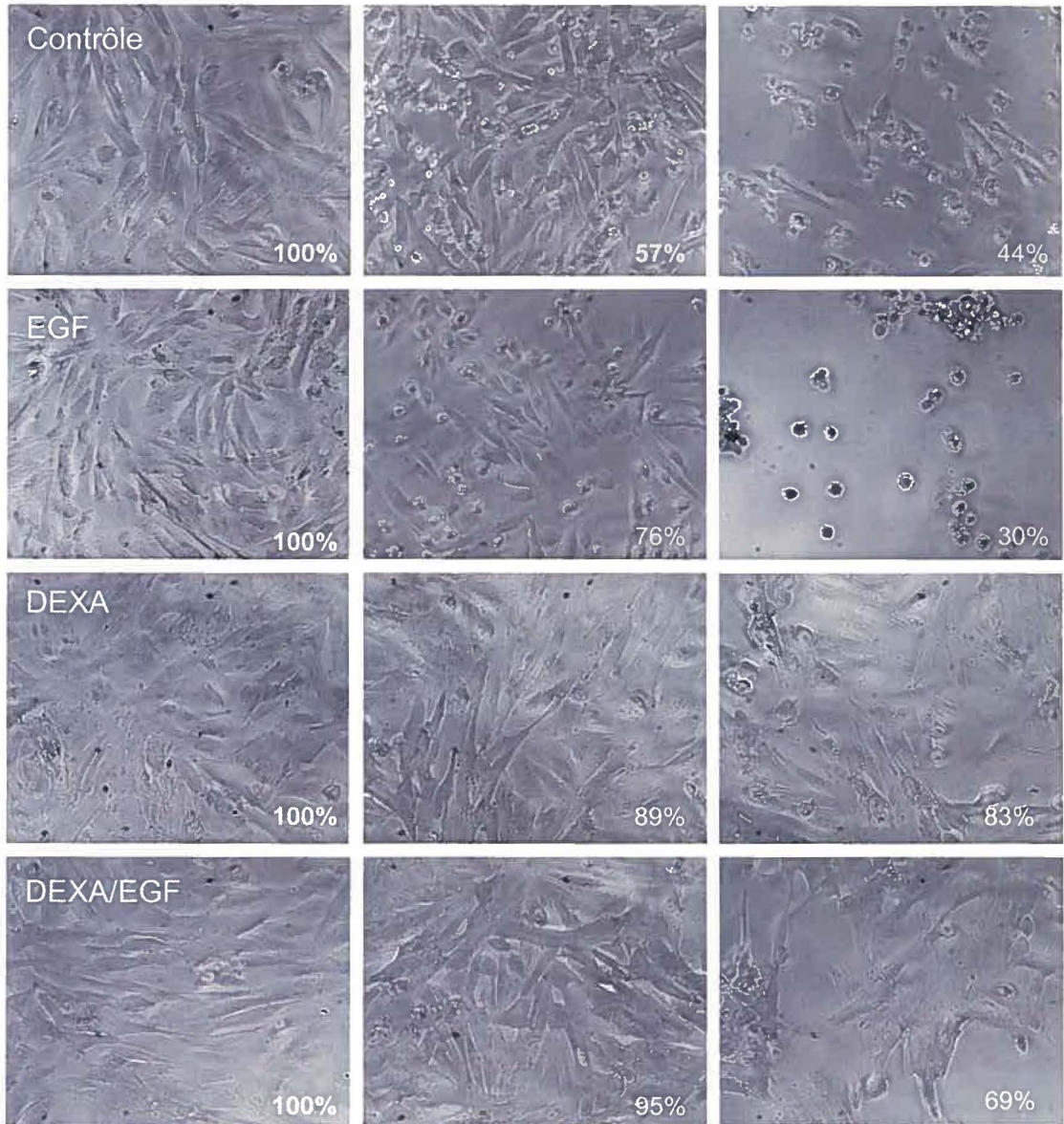
Figure 15. Effet de l'EGF et des glucocorticoïdes sur le potentiel adhésif à long terme des cellules HIEC-6.

Micrographies à contraste de phase représentatives des essais d'adhésion long terme sur laminine-1 et 2 de cellules HIEC-6 sans traitement ainsi qu'avec un traitement préalable de 72 heures à 20ng/ml d'EGF, 0,1 μ M de dexaméthasone ou une combinaison. Après l'ensemencement, les cellules étaient incubées à 37°C pendant 16 heures. Pour chacune des expériences, l'adhésion des cellules traitées sur le collagène de type I représentait l'adhésion cellulaire maximale (100%). L'adhésion non spécifique a été déterminée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

Collagène

Laminine-1

Laminine-2



3.3. Identification des intégrines justifiant l'adhésion sur laminine-1 des cellules HIEC-6 traitées à l'EGF

Suites à ces expériences, une analyse plus exhaustive du mode adhésif des cellules traitées à l'EGF a été effectuée par l'utilisation d'anticorps neutralisants solubles dirigés contre certaines sous-unités des intégrines pouvant lier la laminine-1 (figure 16). L'emploi d'agents inhibiteurs a permis de révéler les intégrines impliquées dans ce processus physiologique. L'inhibition non spécifique a été déterminée par l'incubation des cellules HIEC-6 traitées en présence d'un anticorps IgG de souris. Premièrement, les tests d'inhibition d'adhésion cellulaire à court terme démontrent que l'ajout d'anticorps bloquants individuellement contre les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ des intégrines n'affecte pas l'adhésion cellulaire (figure 16A). Par contre, en présence d'une combinaison d'anticorps contre les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ le nombre de cellules adhérees diminue significativement de 35%. Cette diminution s'accroît à 90% par l'addition d'un anticorps neutralisant dirigé contre la sous-unité $\alpha 6$ et rejoint les valeurs d'inhibition générées par l'anticorps bloquant de la sous-unité $\beta 1$.

De plus, les micrographies à contraste de phase des tests d'inhibition à long terme soutiennent que l'ajout d'anticorps neutralisants contre les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 6$ a peu d'effet sur l'adhésion des cellules (figure 16B). Par contre, l'addition d'anticorps bloquants contre la sous-unité $\beta 1$ provoque une perte

d'adhésion importante causant la formation de nombreux agrégats cellulaires. Ces résultats témoignent sans équivoque d'une adhésion à la laminine-1 de type intégrine $\beta 1$ dépendante pour les cellules HIEC-6 traitées à l'EGF.

3.4. Détermination des intégrines permettant l'adhésion sur laminine-1 des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes

Il a été démontré précédemment que les glucocorticoïdes provoquaient des changements significatifs dans l'expression des intégrines, la morphologie et l'adhésion cellulaire. L'analyse des intégrines impliquées dans l'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à la dexaméthasone a tout d'abord été effectuée pour la laminine-1 (figure 17). Les tests d'inhibition d'adhésion cellulaire ont été effectués à l'aide d'anticorps neutralisants. L'inhibition non spécifique a été définie par l'utilisation d'un anticorps IgG de souris. Les essais à court terme montrent que l'ajout d'anticorps contre la sous-unité $\alpha 1$ diminue partiellement l'adhésion des cellules HIEC-6 (figure 17A). La neutralisation de cette sous-unité en combinaison avec $\alpha 2$ réduit le nombre de cellules adhérentes à 25 %. Ce résultat est similaire à celui obtenu par l'addition d'anticorps bloquants contre $\beta 1$. L'incubation des cellules en présence d'un anticorps neutralisant dirigé contre la sous-unité $\beta 4$ seule ou combinée à $\beta 1$ n'a aucun effet sur l'adhésion cellulaire.

De plus, les micrographies à contraste de phase des essais à long terme pour les cellules HIEC-6 traitées à la dexaméthasone soulignent une implication majeure des intégrines à sous-unités $\beta 1$ pour leur adhésion à la laminine-1 (figure 17B).

3.5. Définition du mode adhésif sur laminine-2 des cellules HIEC-6 traitées aux glucocorticoïdes

Les résultats obtenus ont indiqué qu'en présence de dexaméthasone, les cellules HIEC-6 avaient une adhésion majoritaire de type intégrine $\beta 1$ sur la laminine-1. Afin de déceler des différences dans le mode adhésif de ces cellules, des tests d'inhibition ont été produits sur la laminine-2 à l'aide d'anticorps neutralisants. L'inhibition non spécifique a été déterminée par l'utilisation d'un anticorps IgG de souris. Les essais à court terme indiquent que la présence d'anticorps contre les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou la combinaison ne réduit pas le nombre de cellules adhérees (figure 18). Par contre, l'ajout d'un anticorps dirigé contre la sous-unité $\beta 1$ diminue significativement de 20% l'adhésion cellulaire. Pour caractériser l'adhésion résiduelle, un anticorps bloquant contre $\beta 4$ a été utilisé sans aucun effet. Afin de neutraliser d'autres récepteurs, l'héparine a été utilisée. Cette dernière est connue pour inhiber les interactions entre les laminines et les récepteurs de type héparane sulfate ainsi que le dystroglycan. En présence d'héparine, le nombre de cellules HIEC-6 adhérees est comparable au contrôle IgG.

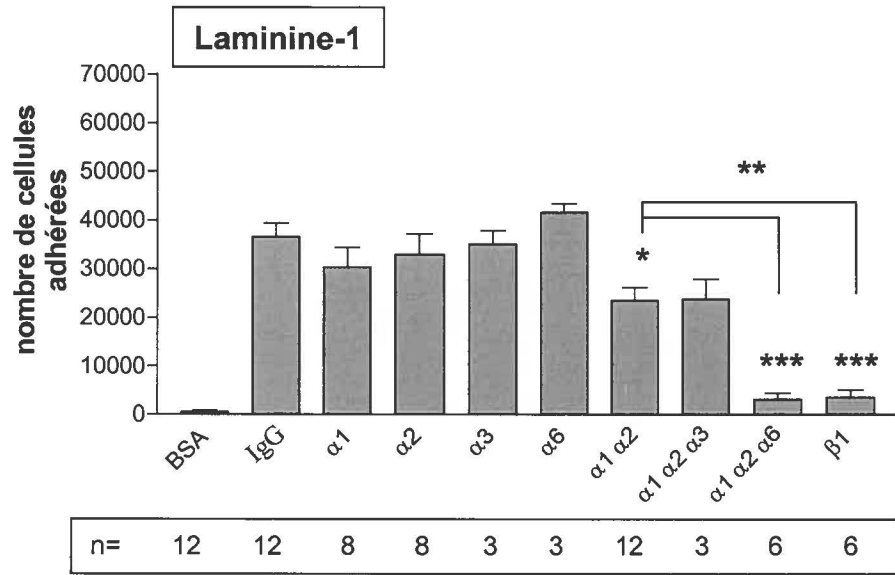
En plus, les combinaisons $\beta 1$, $\beta 4$ et héparine ne permettent pas de bloquer cette adhésion résiduelle. Par conséquent, le mode adhésif des cellules HIEC-6 traitées à la dexaméthasone diffère selon l'isoforme de laminine. Contrairement à la laminine-1, les intégrines de type $\beta 1$ ont une contribution mineure dans l'adhésion de ces cellules à la laminine-2.

Figure 16. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à l'EGF, sur la laminine-1, est intégrine $\beta 1$ dépendante via les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 6$.

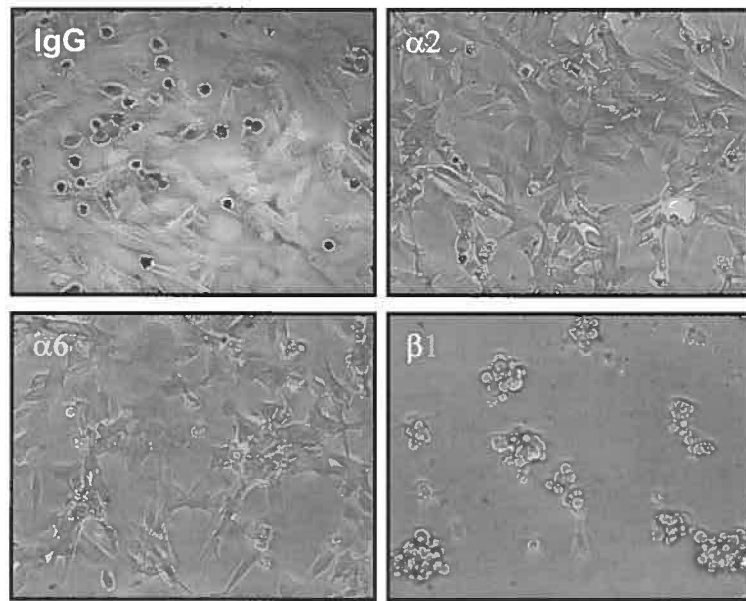
A. Les cellules HIEC-6, préalablement traitées pendant 72 heures avec 20ng/ml d'EGF, ont étéensemencées dans des puits contenant de la laminines-1 à une concentration de 5 μ g/ml. Les essais d'inhibition d'adhésion à court terme ont été effectués à 37°C pour une période de 30 minutes en présence d'anticorps contrôle et neutralisants (IgG de souris, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\beta 1$). Le nombre de cellules adhérees a été déterminé par une courbe standard sur le collagène de type I. L'adhésion non spécifique a été quantifiée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de n données (n = 3-12). Des différences statistiques ont été notées suite à la neutralisation des intégrines (* p < 0, 02 ; ** p < 0, 002; *** p < 0, 0001 ANOVA et test de comparaison Bonferroni).

B. Micrographies à contraste de phase d'un essai d'inhibition d'adhésion à long terme sur laminine-1 de cellules HIEC-6 préalablement traitées pendant 72 heures avec 20ng/ml d'EGF. Après l'ensemencement, les cellules étaient incubées à 37°C pendant 16 heures en présence d'anticorps contrôle et neutralisants (IgG de souris, $\alpha 2$, $\alpha 6$ et $\beta 1$). Pour cette expérience, le nombre de cellules adhérees sur la laminine-1 en présence d'IgG de souris représentait l'adhésion cellulaire maximale. L'adhésion non spécifique a été déterminée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

A



B



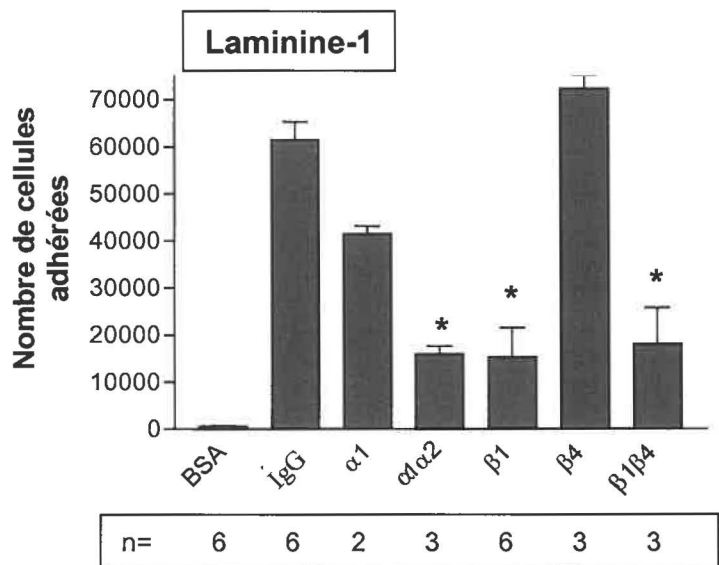
n = 1

Figure 17. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à aux glucocorticoïdes, sur la laminine-1, s'effectue majoritairement par les intégrines de type $\beta 1$ via les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$.

A. Les cellules HIEC-6, préalablement traitées pendant 72 heures avec $0,1\mu\text{M}$ de dexaméthasone, ont étéensemencées dans des puits contenant la laminines-1 à une concentration de $5\mu\text{g/ml}$. Les essais d'inhibition d'adhésion à court terme ont été produits à 37°C pour une période de 30 minutes en présence d'anticorps contrôle et neutralisants (IgG de souris, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 4$). Le nombre de cellules adhérees a été déterminé par une courbe standard sur le collagène I. L'adhésion non spécifique a été quantifiée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de n données ($n = 2-6$). Des différences statistiques ont été détectées suite à la neutralisation des intégrines (* $p < 0,005$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni).

B. Micrographies à contraste de phase d'un essai d'inhibition d'adhésion à long terme sur laminine-1 de cellules HIEC-6 traitées pendant 72 heures avec $0,1\mu\text{M}$ de dexaméthasone. Après l'ensemencement, les cellules étaient incubées à 37°C pendant 16 heures en présence d'anticorps contrôle et neutralisants (IgG de souris, $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 4$). Pour cette expérience, le nombre de cellules adhérees en présence d'IgG de souris représentait l'adhésion cellulaire maximale. L'adhésion non spécifique a été déterminée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

A



B

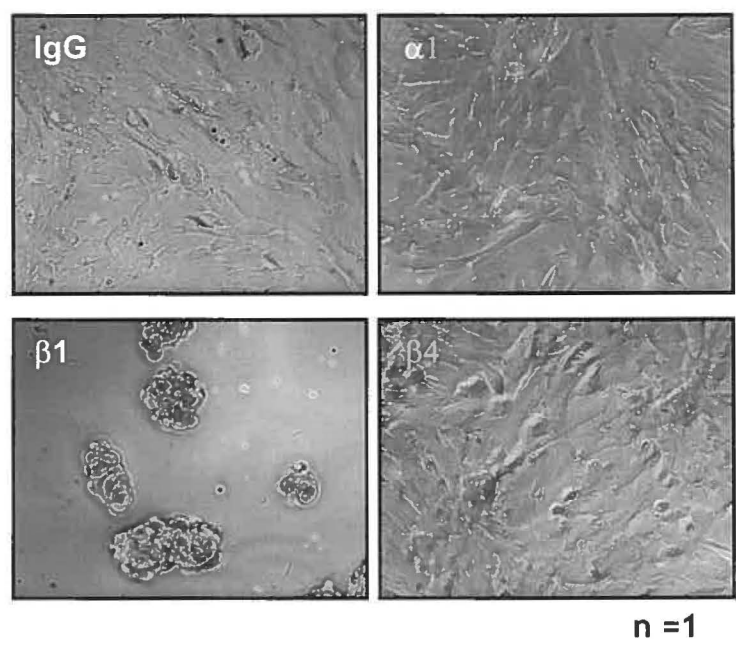
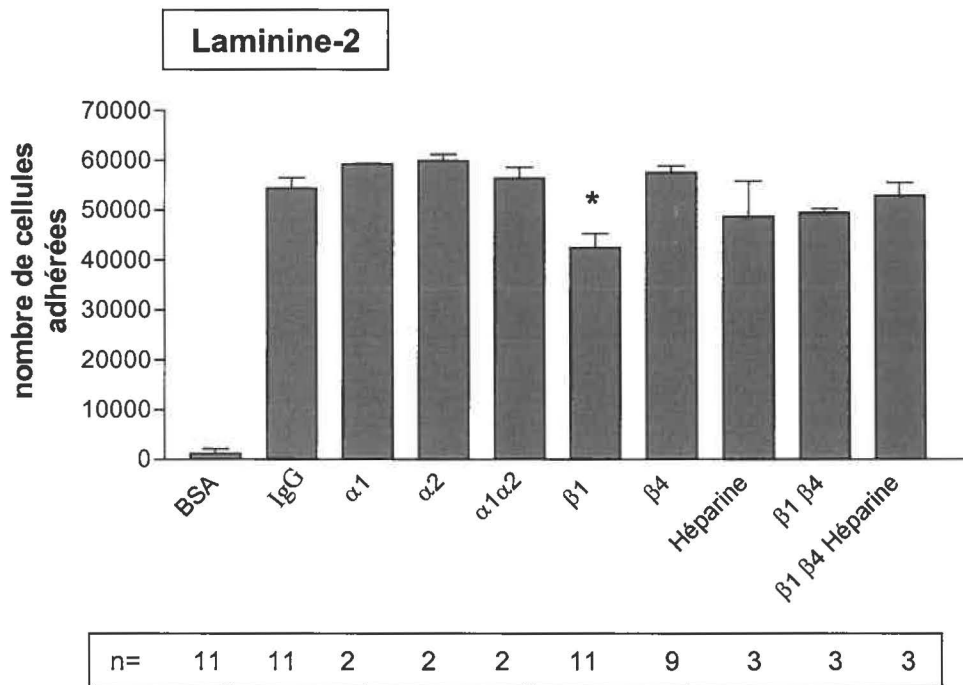


Figure 18. L'adhésion des cellules HIEC-6 traitées à aux glucocorticoïdes, sur la laminine-2, s'effectue par une contribution mineure des intégrines de type $\beta 1$.

Les cellules HIEC-6, préalablement traitées pendant 72 heures avec $0,1\mu\text{M}$ de dexaméthasone, ont étéensemencées dans des puits contenant la laminines-2 à une concentration de $5\mu\text{g/ml}$. Les essais d'inhibition d'adhésion à court terme ont été effectués à 37°C pour une période de 30 minutes en présence d'anticorps contrôle et neutralisants (IgG de souris, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 4$) ainsi que par l'ajout d'inhibiteur pharmacologique (héparine). Le nombre de cellules adhérees a été déterminé par une courbe standard sur le collagène I. L'adhésion non spécifique a été quantifiée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de n données (n = 2-11). Des différences statistiques ont été notées suite à la neutralisation des intégrines (* $p < 0,002$ ANOVA et test de comparaison Bonferroni).



4. Caractérisation dans la muqueuse intestinale humaine de l'expression du dystroglycan, un récepteur cellulaire pour les laminines

4.1. Expression du dystroglycan dans les tissus fœtaux et l'intestin grêle adulte ainsi que dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain

Afin de caractériser l'expression du dystroglycan dans l'intestin grêle humain, des analyses par RT-PCR ont été produites sur des tissus fœtaux. Tout d'abord, les résultats montrent une forte expression de l'ARNm dans le muscle strié et plus faiblement pour le rein ainsi que le poumon (figure 19A). Les quantités relatives de transcrits pour le côlon et l'intestin grêle se rapprochent des valeurs obtenues pour les tissus d'origine non musculaire. La caractérisation du dystroglycan dans les fractions tissulaires de l'intestin grêle fœtal révèle une expression soutenue de ce gène dans le muscle lisse et l'épithélium. De plus, l'analyse des ARNm du dystroglycan dans les tissus fœtaux et adultes suggère une diminution de l'expression associée avec la maturation terminale de l'intestin grêle (figure 19B).

Dans les lignées cellulaires épithéliales, les quantités relatives du transcrit semblent légèrement plus élevées pour les cellules HIEC-6 ainsi que pour les cellules Caco-2/15 à sous-confluence et à confluence 0 mais ces changements dans l'expression sont non significatifs (figure 20A).

L'analyse de l'expression protéique de la sous-unité β dans les modèles cellulaires démontre une présence du dystroglycan dans les cellules HIEC-6 et Caco-2/15 (figure 20B). De même, l'expression de la protéine dans les cellules Caco-2/15 à partir de la confluence cellulaire semble conserver la tendance du transcrit. Par conséquent, au cours du processus de différenciation, les résultats ne démontrent pas de modulation importante des niveaux d'ARNm ou de la sous-unité β dans les cellules Caco-2/15.

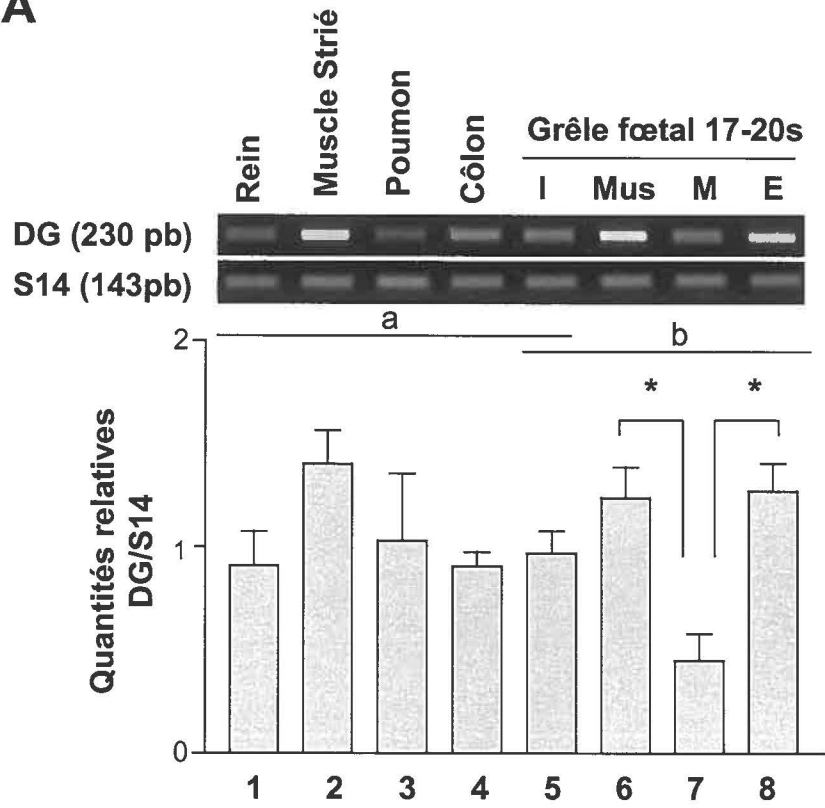
Figure 19. Expression du dystroglycan dans les tissus fœtaux et l'intestin grêle adulte humain

A. RT-PCR représentatif de l'ARNm du dystroglycan dans les tissus fœtaux tels que le rein (1), le muscle strié (2), le poumon (3), le côlon (4) et l'intestin grêle fœtal intact (5) ainsi que les fractions tissulaires de muscle lisse (6), de mésenchyme (7) et d'épithélium (8). Deux analyses statistiques ont été effectuées sur ces échantillons. La première a permis de comparer les quantités relatives des différents tissus fœtaux (a) et la seconde a été produite pour les fractions tissulaires (b).

B. Analyse représentative des transcrits du dystroglycan, au cours du développement, dans l'intestin grêle fœtal âgé entre 17 et 20 semaines (1) et dans les spécimens adultes (2).

Les quantités relatives d'ARNm pour le dystroglycan ont été déterminées par rapport à l'expression du transcrit S14 (n = 3). Des différences statistiques ont été relevées pour les quantités relatives de messenger dans les fractions tissulaires d'intestin grêle (*p < 0,01 ANOVA et test de comparaison Bonferroni)

A



B

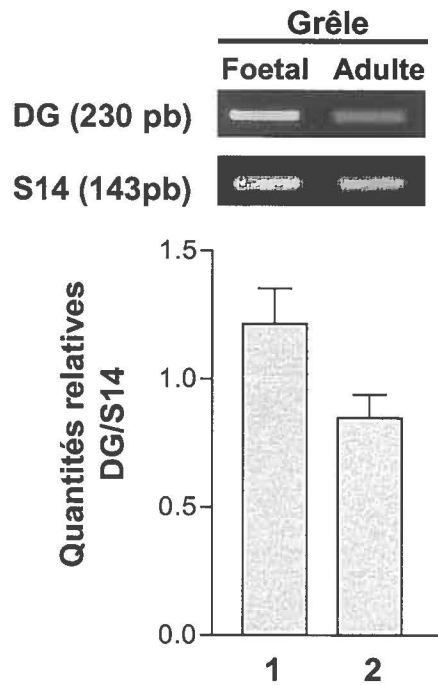
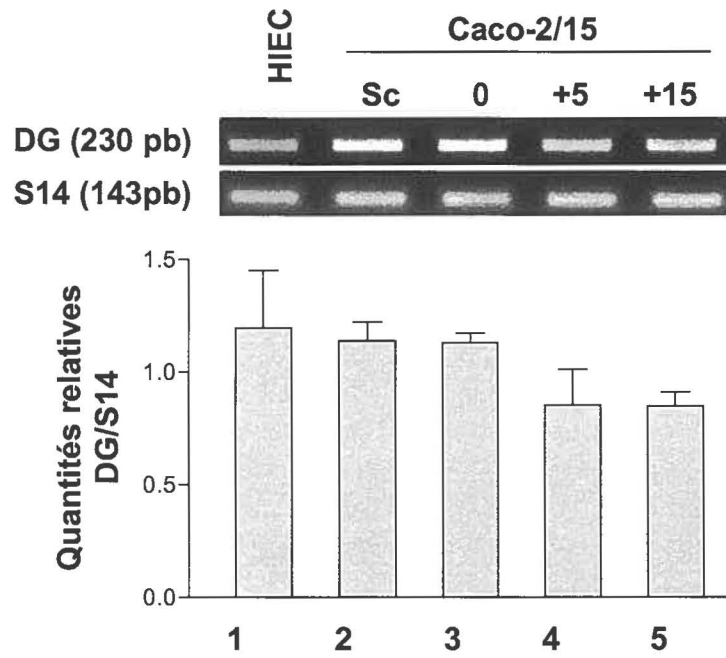
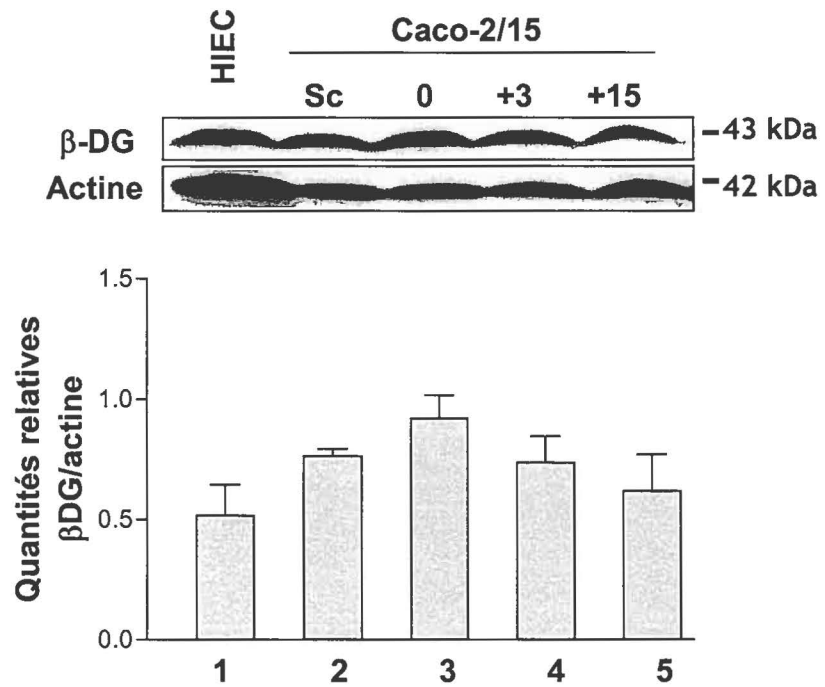


Figure 20. Expression du dystroglycan dans les modèles cellulaires de l'épithélium intestinal humain

A. RT-PCR représentatif de l'ARNm du dystroglycan dans les lignées cellulaires HIEC-6 (1) et Caco-2/15 à différentes confluences cellulaires (2-5). Les quantités relatives d'ARNm pour le dystroglycan ont été déterminées par rapport à l'expression du transcrit S14 (n = 3). Aucune différence statistique n'a été détectée pour ces échantillons.

B. Immunobuvardage Western d'extraits protéiques totaux de cellules HIEC-6 (1) et Caco-2/15 au cours du processus de différenciation (2-5) pour l'expression de la sous-unité β du dystroglycan (43 kDa). Les protéines (100 μ g/puits) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices. Les quantités relatives ont été déterminées par rapport à l'expression protéique de l'actine. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. Aucune différence statistique n'a été repérée pour l'expression protéique dans ces lignées cellulaires.

A**B**

4.2. Localisation des sous-unités α et β du dystroglycan dans l'intestin grêle

Les résultats précédents ont démontrés que le dystroglycan était exprimé dans les tissus et modèles cellulaires de l'intestin grêle humain. Pour connaître la localisation tissulaire du dystroglycan, l'analyse du patron d'expression a été effectuée pour les sous-unités α et β au cours de la morphogenèse (figure 21 et 22). Des immunofluorescences indirectes ont été produites sur des spécimens d'intestin grêle foetal âgé entre 9 et 21 semaines ainsi que sur des tissus adultes. Premièrement, l'analyse de la sous-unité membranaire β révèle une présence importante de protéine dans la muqueuse intestinale dès la 9^e semaines de vie foetale (figure 21A). La détection de la sous-unité β se caractérise alors par un marquage basal régulier et défini des cellules épithéliales. À la 13^e semaine, son expression est retrouvée dans l'épithélium intervillitaire et villositaire (figure 21B). Ce marquage s'estompe graduellement dans la villosité à partir de la 15^e jusqu'à la 21^e semaine (figure 21C,D). Dans l'intestin grêle adulte, l'expression de la sous-unité β est restreinte au tiers inférieur des cryptes (figure 21E).

Dans un deuxième temps, l'analyse de la sous-unité α permet de constater des différences importantes. Tout d'abord, l'expression épithéliale de la protéine à la 9^e semaine de vie foetale se concentre principalement à l'espace intervillitaire (figure 22A). Dans les villosités en formation, la présence de la sous-unité est très faible et semble absente à l'apex.

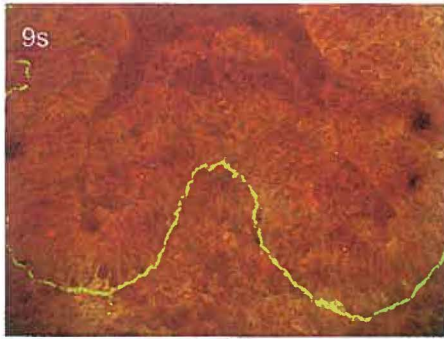
À cette période, le marquage interrompu de la sous-unité α permet de faire la distinction entre les deux composantes protéiques du dystroglycan. De plus, cette sous-unité se retrouve principalement dans les cryptes dès la 13^e semaine et demeure dans ce compartiment tout au long du processus de maturation (figure 22B-D). Cette distribution se définit dans l'intestin grêle adulte à la portion inférieure des cryptes (figure 22E).

Dans les tissus adultes, les micrographies exposent un marquage basal discontinu et d'intensité variable pour les sous-unités α et β du dystroglycan. Enfin, l'immunolocalisation a mis en évidence un marquage associé aux couches musculaires lisses pour ce récepteur hétérodimérique (résultat non présenté).

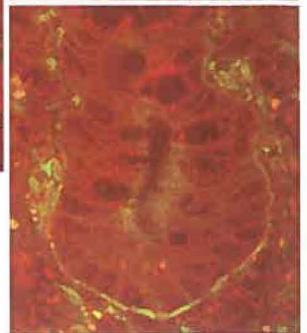
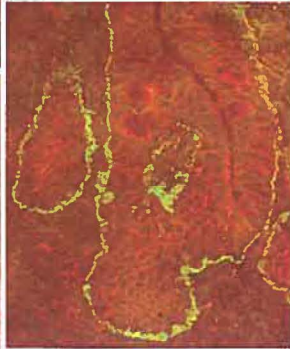
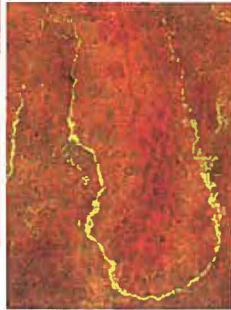
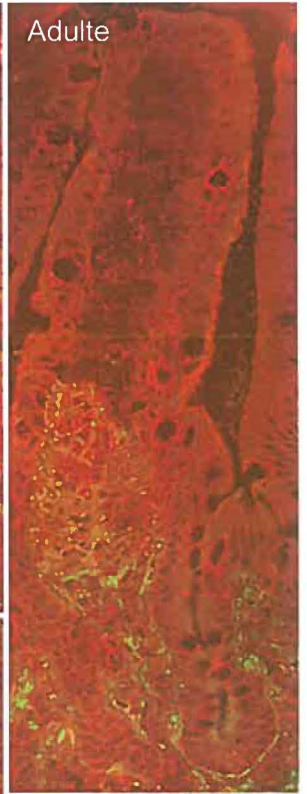
Figure 21. Expression et distribution de la sous-unité β du dystroglycan dans le muqueuse intestinale humaine au cours du développement

Micrographies d'immunofluorescences indirectes de champs représentatifs de jéjunum foetal humain à 9 (A), 13 (B), 15 (C) et 20 (D) semaines ainsi qu'au stade adulte (E) incubé en présence d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la sous-unité β du dystroglycan.

Dès les premières semaines du développement foetal, la sous-unité β du dystroglycan est fortement détectée dans l'épithélium intestinal (A,B). À la 15^e semaines, l'expression épithéliale (e) est réduite dans les villosités (C). Par la suite, le marquage observé est restreint à la région des cryptes, à partir de la 20^e semaine de vie foetal jusqu'au stade adulte. Dans les spécimens adultes, la sous-unité β est également retrouvée dans les cellules musculaires de la lamina propria.



β -Dystroglycan



Développement foetal

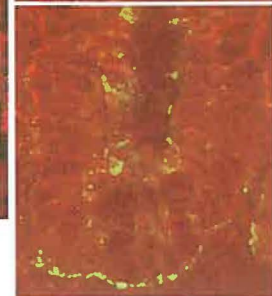
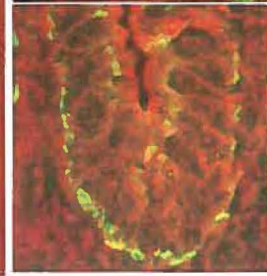
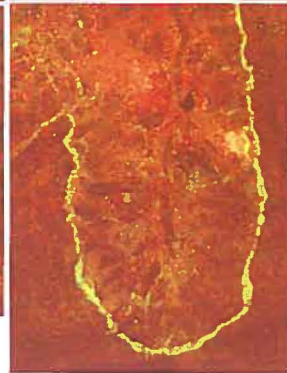
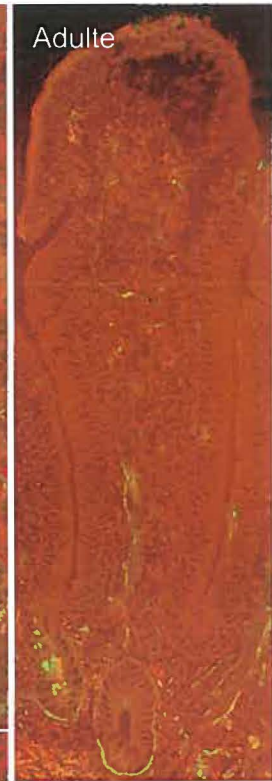
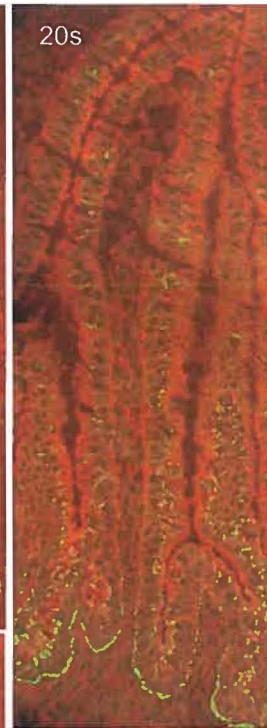
Figure 22. Expression et distribution de la sous-unité α du dystroglycan dans le muqueuse intestinale humaine au cours du développement

Micrographies d'immunofluorescences indirectes représentatives de jéjunum foetal humain à 9 (A), 13 (B), 15 (C) et 20 (D) semaines ainsi qu'adulte (E) incubé en présence d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la sous-unité α du dystroglycan.

À la 9^e et 13^e semaine de vie foetal, la sous-unité α du dystroglycan est faiblement décelée dans l'espace intervillitaire (A). Au cours de la morphogenèse, l'expression épithéliale (e) est limitée à la région des cryptes (C, D). Cette distribution est maintenue dans l'intestin grêle adulte (E). De plus, il est possible d'observer un marquage spécifique dans les cellules musculaires de la lamina propria.



α -Dystroglycan



Développement foetal

4.3. Co-localisation dystroglycan/laminine dans l'intestin grêle adulte

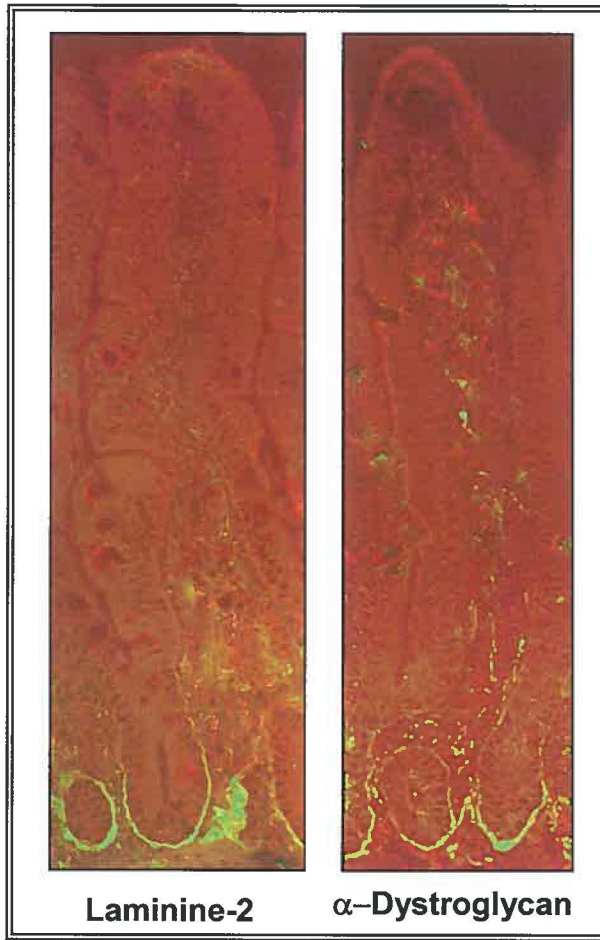
Dans les tissus adultes, le dystroglycan est localisé à la base des cellules épithéliales du tiers inférieur de la crypte (figure 23A). Ce patron d'expression rappelle étrangement celui de la laminine-2. Pour déterminer les possibilités d'interactions ligand-récepteur entre ces deux molécules, des études de co-localisation ont été effectuées par immunofluorescence indirecte sur des spécimens d'intestin grêle adulte (figure 23B). Le dystroglycan a été révélé par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité β . Pour la laminine-2, les chaînes $\gamma 1\beta 1$ ont été détectées à l'aide d'un anticorps polyclonal. Il est à noter que ces chaînes composent principalement les laminine-2 et 10 exprimées dans les cryptes et les villosités respectivement (Teller et Beaulieu, 2001). La superposition du marquage dystroglycan/laminine laisse apparaître une co-localisation irrégulière à la base des cellules épithéliales situées au fond des cryptes. Cette observation est associée au patron d'expression discontinu du dystroglycan. Contrairement au récepteur cellulaire, la détection des chaînes $\gamma 1\beta 1$ révèle une présence uniforme de la laminine dans la membrane basilaire péricryptale. Les résultats de double marquage indiquent donc une co-distribution du dystroglycan et des chaînes $\gamma 1\beta 1$ dans les cryptes intestinales adultes.

Figure 23. Co-distribution du dystroglycan et des chaînes $\gamma 1\beta 1$ des laminines dans la muqueuse de l'intestin grêle adulte.

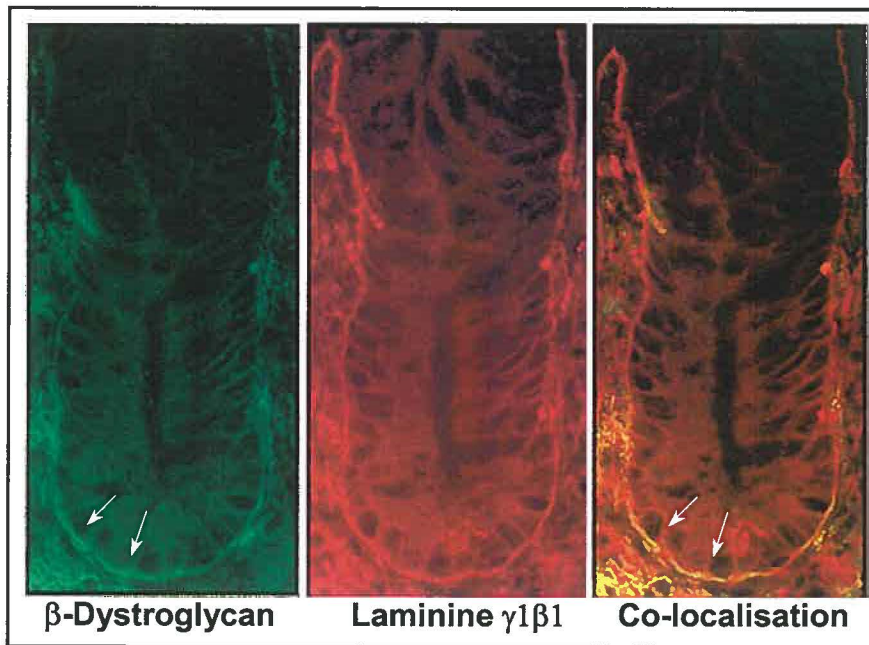
A. Micrographies d'immunofluorescences indirectes représentatives de jéjunum humain adulte incubé en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre la chaîne $\alpha 2$ des laminines et la sous-unité α du dystroglycan. L'expression de la sous-unité α du dystroglycan semble co-localiser avec la laminine-2 présente dans la membrane basilaire péricryptale.

B. Micrographies d'immunofluorescences indirectes représentatives de jéjunum humain adulte incubé en présence d'un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la sous-unité β du dystroglycan et les chaînes $\gamma 1\beta 1$ des laminines. La co-distribution est représentée par la couleur jaune suite à la superposition des marquages en fluorescéine (vert) et rhodamine (rouge). L'expression de la sous-unité β du dystroglycan dans l'intestin grêle adulte co-localise parfaitement avec les chaînes $\gamma 1\beta 1$ des laminines. Les flèches indiquent le marquage discontinu du dystroglycan.

A



B



5. Expression du dystroglycan est associé à un type cellulaire spécifique

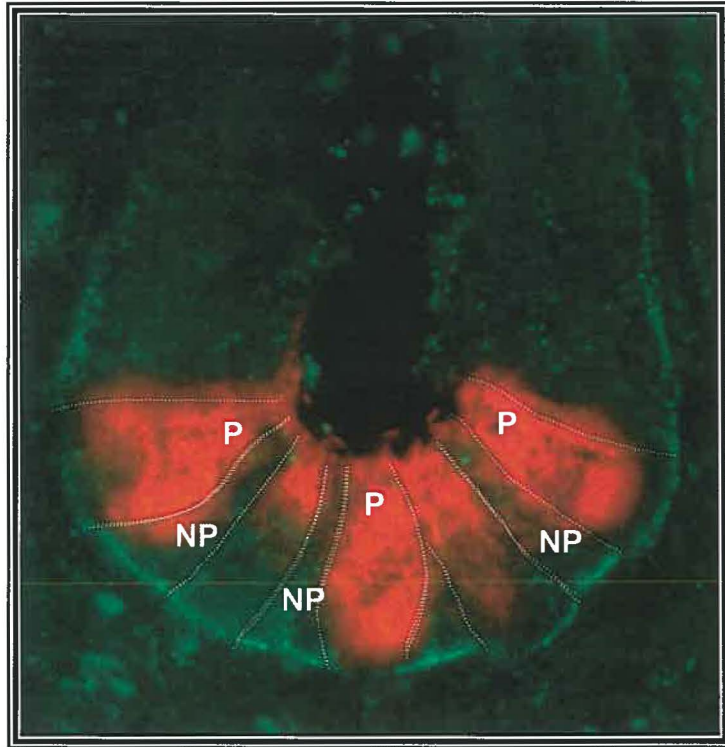
Les analyses histologiques ont permis de déterminer la distribution irrégulière du dystroglycan dans l'épithélium intestinal humain. Ces observations ont mené à l'étude de l'expression du dystroglycan en fonction d'un type cellulaire spécifique. Par immunofluorescence indirecte, des essais en double marquage ont été effectués en utilisant des anticorps spécifiques à la sous-unité α du dystroglycan et à la phospholipase A2 du groupe II (PLA2II), un marqueur des cellules de Paneth (figure 24). La micrographie à fluorescence démontre que l'expression du dystroglycan à la base des cellules de Paneth est faible et même absente dans certains cas. Par contre, les cellules négatives pour la PLA2II expriment plus fortement la protéine. Un décompte cellulaire et une analyse statistique ont permis de visualiser les différences d'expression entre les cellules de Paneth et les cellules non Paneth. En effet, les analyses suggèrent que le dystroglycan est très faiblement exprimé dans les cellules de Paneth comparativement aux cellules non Paneth. Ces résultats permettent d'affirmer que l'expression du dystroglycan est principalement associée aux cellules de type non Paneth.

Figure 24. Expression type cellulaire spécifique du dystroglycan dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte.

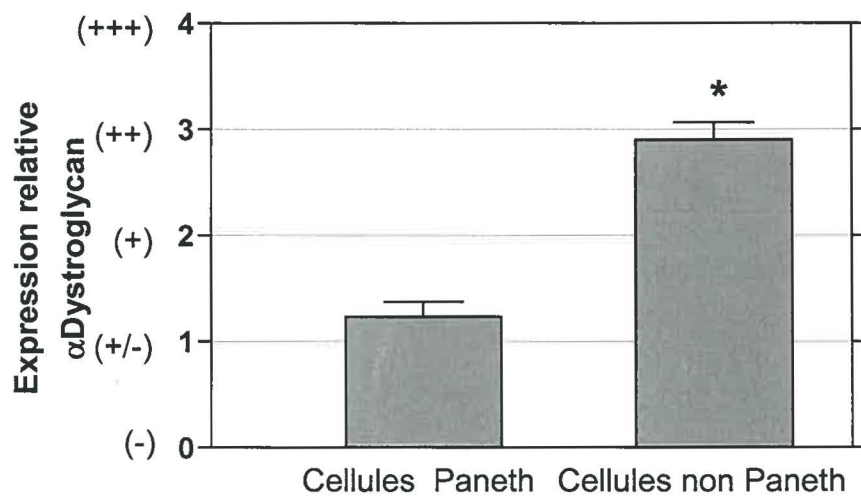
A. Micrographies d'immunofluorescences indirectes représentatives de jéjunum humain adulte incubé en présence d'un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la sous-unité α du dystroglycan (vert) et le PLA2 groupe II (rouge), un marqueur de cellule de Paneth. L'expression du dystroglycan est faiblement associée aux cellules de Paneth (P) comparativement aux cellules de type non Paneth (NP).

B. Quantification relative de l'expression du dystroglycan à la base de chaque type cellulaire (cellules de Paneth et non Paneth). Des valeurs arbitraires ont été attribuées pour quantifier l'expression (absente=0 à très forte=4). Les données ont été obtenues par l'analyse d'au moins 10 cryptes dans 5 spécimens d'intestin grêle adulte sain. Une différence statistiquement significative a été notée entre les deux groupes (* $p < 0,0001$ Test t)

A



B



6. Analyse d'une adhésion fonctionnelle via le dystroglycan pour les cellules HIEC-6

Dans les tissus musculaires, le dystroglycan permet de lier solidement les cellules à la matrice extracellulaire. Afin de valider la contribution du dystroglycan dans l'ancrage des cellules épithéliales intestinales, des tests d'inhibition d'adhésion ont été effectués sur la laminine-1 pour les cellules HIEC-6. L'héparine, un agent pharmacologique, a été utilisé pour inhiber les interactions dystroglycan/laminine (Pall et al., 1996). De plus, la concentration des ions calcium dans le milieu d'adhésion a été augmentée afin de permettre les liaisons récepteur/ligand. Les résultats démontrent qu'en présence d'héparine, le nombre de cellules adhérentes diminue de 28% (figure 25A). Cette inhibition partielle de l'adhésion des cellules HIEC-6 suggère que le dystroglycan est fonctionnel. De plus, les micrographies à contraste de phase soulignent l'effet d'inhibition partielle de l'héparine par des changements très subtils de la morphologie cellulaire (figure 25B). En effet, l'étalement cellulaire semble moins important en présence d'héparine.

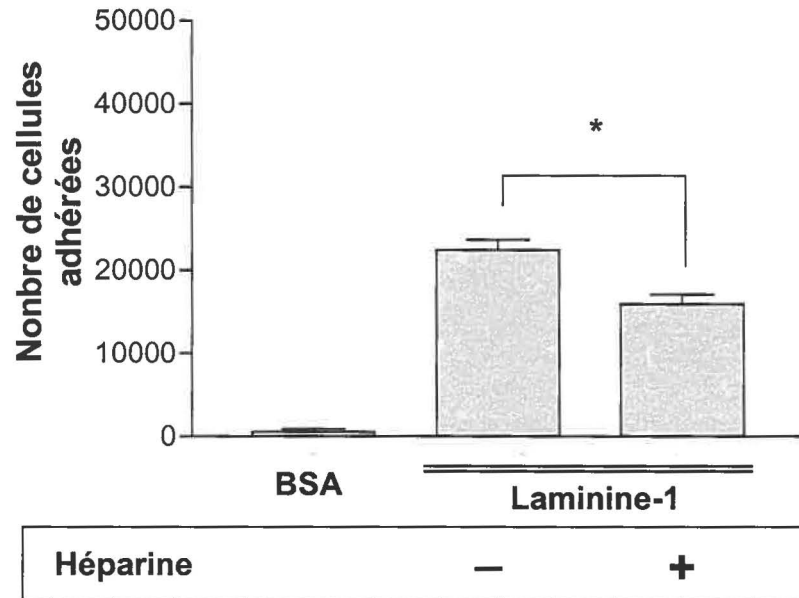
Figure 25. Adhésion fonctionnelle du dystroglycan dans le modèle cellulaire HIEC-6

A. Les cellules HIEC-6 ont étéensemencées dans des puits contenant de la laminine-1 à une concentration de 5µg/ml. Les essais d'inhibition d'adhésion à court terme ont été effectués à 37°C pendant 30 minutes en présence de l'agent pharmacologique neutralisant (héparine). Le nombre de cellules adhérees a été déterminé par une courbe standard sur le collagène de type I. L'adhésion non spécifique a été quantifiée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

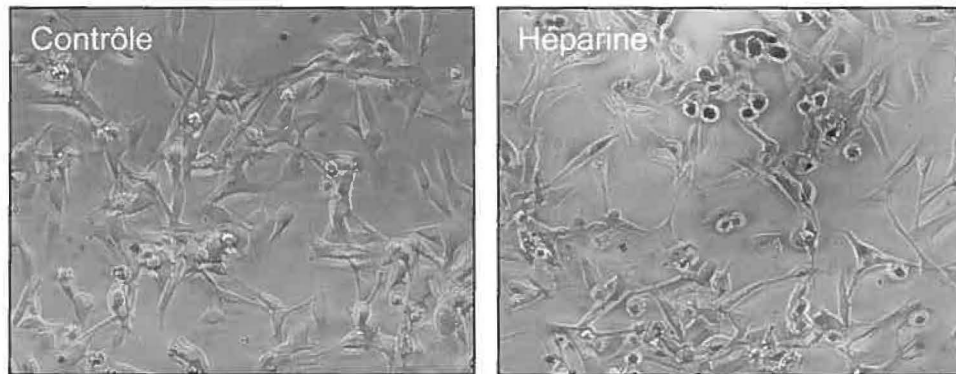
Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Des différences statistiques ont été décelées suite à la neutralisation du dystroglycan (* $p < 0,0001$ Test t).

B. Micrographies à contraste de phase d'un essai d'inhibition d'adhésion à long terme sur laminine-1 de cellules HIEC-6. Après l'ensemencement, les cellules étaient incubées à 37°C pendant 16 heures en présence d'héparine, l'agent inhibiteur. Pour cette expérience, le nombre de cellules adhérees sur la laminine-1 en absence d'héparine représentait l'adhésion cellulaire maximale. L'adhésion non spécifique a été déterminée par l'interaction des cellules avec l'agent de blocage BSA 2%.

A



B



IV - DISCUSSION

1. Le dystroglycan est présent dans l'épithélium intestinal humain et constitue un récepteur potentiel pour les laminines.

Initialement associé aux tissus musculaires, le dystroglycan a depuis été retrouvé dans divers organes tels que le rein, le foie, le poumon, le pancréas et le cerveau (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Toutefois, jusqu'à présent, aucun écrit n'a rapporté l'expression et la localisation de ce récepteur dans l'intestin grêle humain. Les observations accumulées au cours de cette étude ont permis de confirmer sa présence dans la muqueuse intestinale humaine.

Tout d'abord, les données obtenues ont démontré que l'expression du gène *DAG1* dans le modèle intestinal se rapprochait davantage des tissus d'origine non musculaire, où la détection du messenger était plus faible (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). En plus d'une expression réduite, il est maintenant connu que la composition du complexe protéique associé au dystroglycan diffère dans les tissus épithéliaux. (Durbeej et Campbell, 1999). Dans un deuxième temps, l'analyse histologique du récepteur hétérodimérique a montré qu'il était localisé à l'interface épithélio-mésenchymateuse. La présence du dystroglycan dans les modèles cellulaires récapitulant l'axe crypte villosité (Pageot et al., 2000) ainsi que la forte expression de son transcrite dans la fraction épithéliale indiquent que le récepteur se retrouve à la membrane des

cellules épithéliales de l'intestin grêle. Cette distribution à la base de l'épithélium a également été observée dans les tissus rénaux et pulmonaires (Durbeej et al., 1995,1998). Au-delà de la localisation tissulaire, les résultats en immunofluorescence indirecte ont révélé que les sous-unités α et β possédaient des patrons d'expression spatio-temporels distincts au cours de la période fœtale. En effet, dès la 9^e semaine de gestation, la sous-unité membranaire β était détectée de façon soutenue à la base de toutes les cellules épithéliales contrairement à la sous-unité α où l'expression était faible et discontinue. Les données semblent indiquer que ces protéines seraient modulées séparément malgré leur origine génique unique.

Depuis quelques années, divers mécanismes de régulation post-traductionnelle ont été mis en lumière. Tout d'abord, certaines études ont rapporté que la sous-unité α du dystroglycan pouvait se dissocier du complexe (Shimizu et al., 1999, Holt et al., 2000). In vitro, il a été démontré que le relargage de la sous-unité α dans le milieu de culture, de certaines lignées cellulaires, était causé par une protéolyse limitée du récepteur (Esapa et al., 2003). Ce clivage se produirait dans la portion N-terminale de la sous-unité membranaire β via des métalloprotéinases de la matrice (Yamada et al., 2001). Dans un contexte de remodelage tissulaire, ce mécanisme serait une manière efficace d'inhiber l'interaction cellule-matrice par la désintégration du complexe. Toutefois, il est à noter que l' α -dystroglycan est glycosylé d'une manière tissu-spécifique produisant ainsi un certain nombre de glycoformes. De plus, lors de cette

étude, l'anticorps monoclonal utilisé contre cette sous-unité reconnaissait un épitope constitué d'hydrate de carbone (Losasso et al., 2000). La possibilité d'une altération de la glycosylation ne peut donc être exclue puisque l'inhibition de cette modification post-traductionnelle n'empêche pas l'expression du récepteur à la surface cellulaire (Esapa et al., 2003). Cependant, les chaînes polysaccharidiques de la sous-unité α sont essentielles aux interactions de type récepteur-ligand (Winder, 2001). Par conséquent, une anomalie dans le patron de glycosylation peut inhiber les liaisons protéiques au même titre qu'un clivage protéolytique. Cette altération pourrait être secondaire à la régulation de l'expression de la fukutine, une glycosyltransférase (Brockington et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Kanagawa et al., 2004). Une étude a publié récemment la co-localisation de la fukutine et du dystroglycan dans l'épithélium du tractus digestif de la souris (Saito et al., 2004). De même, l'analyse de spécimens d'intestin grêle provenant de patients atteints de dystrophie musculaire congénitale de type Fukuyama (FCMD), dont le gène de la fukutine est muté, a démontré que la détection immunologique de l' α -dystroglycan était réduite ou absente (Saito et al., 2004). Néanmoins, les fonctions du dystroglycan peuvent être régulées par la protéolyse et/ou la glycosylation. Dans certaines cellules cancéreuses, ces deux mécanismes coexistent et contribuent à la neutralisation fonctionnelle du dystroglycan lors du processus invasif (Sgambato et al., 2003; Singh et al., 2004). L'utilisation d'un anticorps reconnaissant les formes hypoglycosylées de la sous-unité

α (Pavoni et al., 2005) permettrait l'identification des modes de régulation présents dans la muqueuse intestinale humaine au cours de la période fœtale.

Dans les tissus adultes, les deux sous-unités sont confinées au tiers inférieur des cryptes. Ce phénomène de restriction dans les spécimens adultes est aussi observé niveau du transcrit et semble être relié à une baisse de l'activité transcriptionnelle malgré l'augmentation du ratio villosité/crypte survenant au cours de la maturation intestinale. Cette diminution d'expression de l'ARNm, au stade adulte, ne semble pas être unique à l'intestin grêle puisque chez la souris des résultats comparables ont été obtenus pour le rein (Durbeej et al., 1995).

En plus d'une expression dans la muqueuse intestinale, les analyses par immunofluorescence indirecte ont démontré une co-localisation parfaite du récepteur avec les chaînes $\beta_1\gamma_1$ des laminines dans les spécimens adultes. Cette co-distribution suggère une interaction potentielle entre le dystroglycan et la laminines-2 ($\alpha_2\beta_1\gamma_1$). Dans d'autres systèmes, ce récepteur est reconnu pour lier spécifiquement les laminines 1 et 2 (Yamada et al., 1994; Shimizu et al., 1999; Durbeej et Campbell, 1999; White et al., 2001; Muschler et al., 2002). D'autre part, une interaction de type récepteur-ligand semble être un déterminant important pour la localisation du dystroglycan. Certaines études ont démontré que la présence de ces laminines dans la membrane basilaire

était nécessaire pour une distribution adéquate du récepteur à la base des cellules (Li et al., 2002; Miner et al., 2004).

L'expression du dystroglycan et d'un ligand potentiel, à un même site histologique, laisse entrevoir la possibilité d'une compétence dans l'adhésion cellulaire. Afin d'élucider cette question, des tests d'inhibition d'adhésion ont été effectuées *in vitro* avec les cellules HIEC-6, un modèle de cellules épithéliales cryptales exprimant le récepteur hétérodimérique (Perreault et Beaulieu, 1996). Au cours de ces expériences, l'héparine était utilisée pour bloquer l'interaction dystroglycan-laminine, par l'absence d'anticorps neutralisant fonctionnel. Par conséquent, l'analyse fonctionnelle a été produite sur la laminine-1 puisqu'elle répond à l'action de l'héparine et que son expression est parallèle à celle du dystroglycan dans les stades précoces du développement intestinal humain (Pall et al., 1996; Teller et Beaulieu, 2001). Les résultats des tests d'inhibition ont révélé une perte d'adhésion cellulaire significative. Cependant, il faut être prudent quant à l'élaboration des conclusions puisque l'héparine n'est pas un inhibiteur spécifique du dystroglycan. Par exemple, certaines isoformes de syndécan, une famille de récepteurs membranaires de type héparane sulfate, peuvent également lier les laminines-1/2 et être sensible à l'action de l'héparine (Hoffman et al., 1998; Fujiya et al., 2001; Suzuki et al., 2003). Ainsi, il serait important de confirmer ces résultats par l'utilisation d'un anticorps neutralisant contre le dystroglycan lorsqu'il sera disponible.

De même, l'analyse de composantes intracellulaires associées à la queue cytoplasmique de la sous-unité membranaire β pourrait également définir les fonctions adhésives du dystroglycan dans l'épithélium intestinal humain. Récemment, une étude a démontré que l'utrophine, une protéine ubiquitaire liant le dystroglycan au cytosquelette d'actine, était recrutée uniquement lors d'une interaction entre le dystroglycan et la laminine (Li et al., 2005).

2. La distribution du dystroglycan au tiers inférieur des cryptes suggère une implication au sein de la niche des cellules souches intestinales humaines.

L'immunodétection du dystroglycan, dans les spécimens adultes, a révélé une expression épithéliale restreinte au tiers inférieur des cryptes. En plus, des expériences de co-localisation ont démontré que le dystroglycan était exprimé davantage dans les cellules de type non-Paneth. Ces résultats suggèrent fortement que ce récepteur serait impliqué dans la niche cellulaire souche intestinale humaine. L'association du dystroglycan à un degré de pluripotence n'est pas étrangère à la littérature puisque son expression est détectée dans les cellules épiblastiques dès les premiers stades du développement embryonnaire chez la souris (Williamson et al., 1997; Brooke and Gardner, 1997; Li et al., 2002,2003). Cette apparition précoce du récepteur semble essentielle à plusieurs processus biologiques tels que la morphogenèse épithéliale et la survie cellulaire (Langenbach et Rando, 2002; Weir et Muschler, 2003).

2.1. Le dystroglycan est un système d'ancrage potentiel pour les cellules du compartiment souche intestinal humain.

La présence du dystroglycan à la base des cryptes pourrait contribuer au séjour prolongé des cellules clonogéniques et des cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal adulte. Malgré une expression plus faible du récepteur chez ces dernières, le dystroglycan est reconnu pour avoir une affinité de liaison plus importante que les intégrines d'où la présence ubiquitaire du récepteur dans les tissus musculaires (Collins et al., 2001). De plus, les cellules de Paneth semblent contribuer significativement au microenvironnement spécifique de la niche par la sécrétion localisée de facteurs de croissances et de molécules bioactives (Porter et al., 2002; Bevins, 2004). Ainsi, ce mode d'ancrage permettrait aux cellules d'esquiver le courant migratoire ascendant présent dans l'axe crypte-villosité.

Dans un contexte de renouvellement cellulaire, la possibilité d'un clivage protéolytique de la sous-unité β permettrait la désintégration de ce complexe adhésif. De cette manière, les cellules filles seraient libérées de la niche cellulaire souche et amorceraient ainsi leur migration vers le compartiment villositaire.

2.2. Le dystroglycan et le contrôle de la survie des cellules souches intestinales humaines.

L'implication du dystroglycan dans la survie cellulaire a fait l'objet d'un certain nombre d'études au cours des dernières années (Langenbach and Rando, 2002; Li et al., 2002). Plusieurs types de dystrophies musculaires et le syndrome de Walker-Warburg, des pathologies associées à une altération du potentiel adhésif de ce complexe protéique, ont démontré une augmentation des événements apoptotiques au niveau tissulaire (Dalkilic et Kunkel, 2003; Sabatelli et al., 2003; Girgenrath et al., 2004). L'apoptose n'est pas uniquement observée au cours de la pathogenèse mais également dans les tissus adultes sains où elle semble participer au maintien de l'homéostasie. Ce phénomène de mort cellulaire, l'apoptose spontanée, a été rapporté dans le compartiment des cellules souches intestinales humaines (Potten, 1998; Bach et al., 2000). Cette délétion cellulaire sélective, p53-indépendante, permettrait le contrôle du nombre d'individus inclus dans la population clonogénique. Dans ce contexte, la désintégration du complexe dystroglycan pourrait empêcher la propagation des signaux de survie conduisant ainsi la cellule vers l'apoptose.

3. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ sont des récepteurs associés au compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal humain

La sous-unité $\alpha 1$ des intégrines a été identifiée dans l'intestin grêle foetal, où elle présente un patron d'expression particulièrement original. Au cours du développement, son apparition précède la formation des cryptes et sa distribution dans l'épithélium se limite aux espaces intervillositaires ainsi qu'à la moitié inférieure des cryptes. Dans ces compartiments spécifiques, une population cellulaire majoritairement proliférative s'y retrouve (Arsenault et Ménard. 1987). De plus, l'expression soutenue du messenger et de la protéine, dans les modèles cellulaires prolifératifs indifférenciés, appuient de surcroît les données histologiques. Ces observations tendent à lui attribuer un rôle dans l'activation des voies de signalisation contrôlant la progression du cycle cellulaire. Chez la souris, la mutation du gène *ITGA1* a démontré une diminution significative de la prolifération des cellules fibroblastiques du derme (Pozzi et al., 1998). De même, cette isoforme a été utilisée afin d'isoler des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Deschaseaux et al., 2003; Stewart et al., 2003). Toutefois, l'absence de l'intégrine $\alpha 1$, aux stades précoces du développement, laisse entrevoir un rôle secondaire dans la prolifération de l'épithélium intestinal. D'autre part, la détection marquante de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans le muscle lisse intestinal, où l'incidence mitotique est faible (Kaye et al., 1971; Arsenault et Ménard 1987; Ménard et al., 1994),

supporte également l'hypothèse que ce récepteur puisse être associé à d'autres processus biologiques.

En plus de la sous-unité $\alpha 1$, l'épithélium intestinal exprime également l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au domaine baso-latéral des cellules intervillositaires et cryptales. L'omniprésence de cette sous-unité, au cours du développement, suggère une implication importante dans le maintien d'un état cellulaire prolifératif. Récemment, des études ont établi que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ contribuait à la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin, des glandes mammaires et du rein (Basson et al., 2000; Klekotka et al., 2001; Chen et al., 2004). La sous-unité $\alpha 2$ a également permis l'isolation de cellules pluripotentes de l'épithélium prostatique et de l'épiderme humain (Jones et al., 1995; Collins et al., 2001).

À la lumière de la littérature, cette capacité qu'ont certaines isoformes d'intégrines à soutenir la prolifération semble dépendre du contexte cellulaire (Kirchhofer et al. 1990). Par conséquent, il serait important d'élucider la participation des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans la progression du cycle cellulaire en utilisant un modèle intestinal normal tel que les cellules HIEC-6. L'approche dominant négatif permettrait ainsi de répondre à la question.

4. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ pourraient participer à la formation des cryptes intestinales humaines

La morphogénèse de l'épithélium intestinal constitue un processus complexe où le remodelage de la matrice extracellulaire agit conjointement avec la migration cellulaire (Murakami et al., 1998). L'étude des mécanismes impliqués dans la formation des structures glandulaires a révélé une participation active des intégrines dans le bourgeonnement épithélial (Saelman et al., 1995; Zutter et al., 1995; Zent et al., 2001; Chen et al., 2002; Chen et al., 2004). Dans le contexte intestinal, la culture 3-D de cellules épithéliales, dans le matrigel et le collagène de type I, a démontré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pouvait médier l'organisation architecturale des glandes (Liu et al., 1994; Zhang et al., 2003).

Le remodelage de la matrice extracellulaire nécessite la dégradation et la déposition de *novo* des composantes matricielles. Cet événement particulier est important dans plusieurs processus biologiques et physiopathologiques où les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) semblent jouer un rôle significatif (Langholz et al., 1995; Vu et Werb, 2000; Wiseman et al., 2003; Haas et al., 2004). L'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs, les TIMPs, est régulée de manière spatio-temporelle tout comme celle des intégrines et de certains éléments de la matrice extracellulaire (Tanney et al., 1998; Haas et al., 2004). Par conséquent, il a été rapporté que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ était un modulateur positif des MMPs -1 et 13, des enzymes aptent à cliver le collagène interstitiel (Langholz et al., 1995; Heino, 2000; Eble et al., 2002; Visse et Nagase, 2003).

La MMP-1 et sa pro-forme peuvent également se lier à la surface des cellules via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Eble et al., 2002). De même, l'invasion de cellules cancéreuses mammaires, associée aux isoformes $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ des intégrines, s'effectue par une augmentation de l'expression de la stomelysin-1 (MMP-3) (Lochter et al., 1999). Ainsi, le confinement des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ aux espaces intervillositaires, avant la formation des cryptes, pourrait contribuer à l'invasion des cellules épithéliales dans le mésenchyme sous-jacent via une régulation des métalloprotéinases.

En plus de leur implication dans la dégradation, les intégrines participent activement à l'assemblage et à la réorganisation de la matrice extracellulaire (Cognato et Yurchenco, 2000; Sasaki et al., 2004). Dans un modèle murin du syndrome d'Alport, il a été démontré que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ était impliquée dans la déposition anormale de la chaîne $\alpha 2$ des laminines à la membrane basilaire glomérulaire (Cosgrove et al., 2000 et Sampson et al., 2001). De plus, la mutation du gène *ITGA1*, dans ce modèle animal, présentent des modulations d'expression génique reliées aux protéines de la matrice, aux métalloprotéases et leurs inhibiteurs ainsi qu'aux facteurs de croissances (Sampson et al., 2001). La nature des gènes sensibles à l'absence de la sous-unité alpha 1 supporte une fonction dans l'accumulation de protéines matricielles. Dans le contexte du développement intestinal, les analyses, par immunofluorescence indirecte, ont démontré que l'intégrine $\alpha 1$ apparaissait faiblement vers la 14^e semaine de vie foetale. La détection tardive de cette isoforme et la consolidation de son

expression dans la région cryptale, entre la 16^e et 20^e semaine, semble coïncider avec l'apparition de la chaîne $\alpha 2$ des laminines (Perreault et al., 1995). Par conséquent, l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ pourrait être impliquée dans le recrutement de la laminine-2 à la surface des cellules épithéliales du compartiment prolifératif. Toutefois, l'analyse histologique de souris mutantes pour le gène *ITGA1* n'a révélé aucun impact majeur au niveau de l'intestin grêle (Gardner et al., 1996). Il est à noter que l'absence de phénotype n'empêche pas la disparition de la chaîne $\alpha 2$ des laminines puisque, contrairement à l'être humain, la chaîne $\alpha 1$ persiste au cours du développement murin (Kedinger et al., 1998; Gawlik et al., 2004) et pourrait ainsi avoir un effet compensatoire.

5. Les régulateurs morphogéniques de l'intestin modulent l'expression des intégrines cryptales $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$

Depuis la caractérisation initiale de la famille des intégrines, plusieurs publications ont rapporté la modulation de ces récepteurs au cours de divers processus physiopathologiques tels que le développement et la réparation tissulaire, l'inflammation ainsi que la tumorigenèse (Kim et Yamada, 1997). Jusqu'à ce jour, un nombre important de facteurs de croissance, d'hormones et d'agents pharmacologiques ont démontré une activité régulatrice sur les niveaux d'expression des intégrines (Chen et al., 1993; Kim et Yamada, 1997; Desloges et al., 1998; Ryu et al., 1999; Sawhney et al., 2002).

Les rôles divergents des intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ dans la morphogénèse épithéliale, la progression du cycle cellulaire et la régulation des gènes suggèrent que ces récepteurs soient également contrôlés par des mécanismes différents (Zutter et al. 1995; Langholz et al., 1995; Wary et al., 1996). Dans cette étude, les résultats ont révélé une modulation différentielle des isoformes cryptales, en présence du facteur de croissance épidermique (EGF) et de la dexaméthasone. Dans les cellules HIEC-6, les analyses ont démontré que l'expression de la sous-unité $\alpha1$ était régulée positivement par la dexaméthasone et négativement par l'EGF. Par contre, en présence des deux facteurs, l'intégrine répondait essentiellement à une régulation EGF dépendante neutralisant ainsi l'effet des glucocorticoïdes. Ces variations quantitatives, de la sous-unité $\alpha1$, sont principalement appuyées par des observations antérieures effectuées sur différents modèles du tractus digestif (Sawhney et al., 2002; Pichard et al., 2001; Murakami et al., 1998). D'autre part, dans ce cadre expérimental, l'EGF constitue l'unique agent modulateur de la sous-unité $\alpha2$. Il a été démontré en culture cellulaire et organotypique que le facteur de croissance épidermique permettait d'augmenter l'expression de l'intégrine $\alpha2$. Cette réponse des cellules intestinales à l'EGF a également été rapporté précédemment (Sawhney et al., 2002; Basson et al., 1992). Ainsi, ces résultats démontrent que les sous-unités $\alpha1$ et $\alpha2$ des intégrines peuvent être modulées par l'EGF et les glucocorticoïdes, des régulateurs importants du développement intestinal.

5.1. Régulation négative de la sous-unité $\alpha 1$ par EGF et le déclin des récepteurs EGF

Les évènements morphogéniques, associés à la muqueuse intestinale, sont régulés en partie par des facteurs solubles tels que les hormones et les facteurs de croissances (Nanthakumar, 2001). L'implication des intégrines dans l'architecture tissulaire et leur régulation spatio-temporelle, au cours de la maturation intestinale, suggère une étroite interaction entre ces récepteurs et les facteurs de croissances, *in vivo*.

Dans l'intestin grêle humain, l'apparition tardive de la sous-unité $\alpha 1$, vers la 14^e semaine de gestation, semble coïncider avec le déclin des récepteurs EGF principalement localisés dans les compartiments prolifératifs de l'épithélium (Pothier et Ménard, 1988; Ménard et Pothier, 1991). De même, les analyses *in vitro* ont démontré que l'EGF régulait négativement l'expression de l'intégrine $\alpha 1$ dans le modèle HIEC-6. Ainsi, dans les stades précoces du développement, l'action de l'EGF et de ses récepteurs sur l'épithélium intestinal pourrait retarder la détection de cette intégrine. Toutefois, pour les facteurs de croissances, une dépendance linéaire existe entre la réponse cellulaire et le pourcentage d'occupation des récepteurs (Wiley et al., 2003). Par conséquent, la réduction des complexes EGF-récepteurs pourrait atténuer l'effet répresseur du facteur de croissance sur l'expression de la sous-unité $\alpha 1$. D'autre part, il a été démontré récemment que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ pouvait également être un

régulateur négatif du récepteur EGF via l'activation d'une protéine tyrosine phosphatase (Mattila et al., 2005).

5.2 Sensibilité des spécimens aux glucocorticoïdes

Dans le modèle cellulaire HIEC-6, la présence des glucocorticoïdes a permis une modulation positive de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ contrairement à la sous-unité $\alpha 2$ où l'expression est restée inchangée. Toutefois, ces résultats n'ont pas été supportés par les analyses effectuées en culture organotypique. En effet, l'expression soutenue de l'intégrine $\alpha 1$ dans les cellules musculaires compliquait son observation dans l'épithélium. Par conséquent, les modulations étaient difficilement perceptibles tant dans l'épithélium que dans les cellules musculaires où l'expression semblait avoir atteint la saturation. Cette ambiguïté amène donc à questionner la sensibilité des spécimens aux glucocorticoïdes. Différents éléments peuvent influencer la réponse d'un tissu aux agents stéroïdiens dont l'affinité de liaison du récepteur pour l'hormone ou l'ADN, les interactions avec les cofacteurs et les facteurs de transcriptions, ainsi que les niveaux d'expression des récepteurs (Pujols et al., 2002; Beato et Klug, 2000). Plusieurs études ont démontré l'existence d'une fenêtre temporelle spécifique correspondant au second et au troisième trimestre, où le tissu répond à la présence des glucocorticoïdes (Nanthakumar et al., 2005). Dans la majorité des cas, cette réponse a été quantifiée en mesurant l'activité des disaccharidases (Nanthakumar et al., 2005, Solomon et al., 2001). En culture organotypique, les réponses physiologiques sont observées dès la 12^e

semaine de vie foetal pour l'intestin grêle humain (Arsenault et al., 1985). Par conséquent, l'âge des spécimens utilisés ne semble pas être un facteur limitant puisqu'ils correspondent à la période sensitive.

Ainsi, pour évaluer l'effet des glucocorticoïdes sur l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ en culture organotypique, il serait important de satisfaire un des critères émis par Henning et al., en 1994, soit que l'administration d'un facteur de croissance puisse induire des changements précoces. Dans ces conditions, l'utilisation de spécimens entre 12 et 13 semaines de vie foetale, où l'expression de l'intégrine pourrait être induite prématurément, permettrait de contourner les problèmes de saturation rencontrés dans les explants intestinaux à la mi-gestation. Malheureusement, l'obtention de tissus à ces âges est plutôt rare.

5.3. *In vivo*, implication possible des glucocorticoïdes dans la première phase du développement foetal de l'intestin grêle humain.

Au cours des dernières années, l'action des glucocorticoïdes sur l'épithélium intestinal a été grandement associée à la maturation terminale de ce dernier (Arsenault et Ménard., 1985; Polk et Barnard, 1999; Solomon et al., 2001). Aucun rôle ne semble être attribué à cette hormone pendant la première phase du développement foetal (Colony, 1983). Toutefois, l'intestin grêle est un des rares organes capable de faire la conversion de la cortisone en cortisol entre la 10^e et 20^e semaine de gestation (Murphy et al. 1981). De plus, certaines études

ont démontré que la déglutition du liquide amniotique, un inducteur morphogénique important (Calvert et al., 1983), pouvait s'effectuer dès la 16^e semaine de vie fœtale exposant ainsi davantage l'intestin grêle aux glucocorticoïdes (Abramovich, 1970; Pritchard, 1966). Ces faits semblent appuyer l'hypothèse que les glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle dans la première phase du développement intestinal, période de remodelage de la muqueuse et d'apparition de structures villositaires et cryptales.

Les évènements morphogéniques sont des processus complexes nécessitant, entre autres, une interaction de type cellule-matrice. Au cours de cette étude, il a été démontré que la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines apparaissait au moment de la formation des cryptes et qu'elle était modulée à la hausse, dans les cellules HIEC-6, par la dexaméthasone. Cette réponse cellulaire corrèle parfaitement avec la présence des récepteurs de glucocorticoïdes (GR) dans le compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal (Quaroni et al., 1999; Lentze et al., 1985). De même, l'action de la dexaméthasone sur l'expression de l'intégrine $\alpha 1$ pourrait être directe puisqu'un site de liaison à l'ADN pour les GR est présent chez le poulet pour cette sous-unité des intégrines (Obata et al., 1997). Ainsi, dans un contexte tissulaire, l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 1$ par les glucococoticoïdes pourraient confirmer l'importance du rôle de cette hormone dans la première phase du développement intestinal.

5.4. Glucocorticoïdes et morphologie cellulaire

Les caractéristiques morphologiques des cellules intestinales HIEC-6 traitées à la dexaméthasone supportent les modulations d'expression observées chez les intégrines mais également un changement dans l'organisation du cytosquelette. L'étalement cytoplasmique excessif des HIEC-6 en présence de glucocorticoïdes a été observé précédemment pour d'autres types cellulaires du tractus digestif (Quaroni et Beaulieu, 1997; Murakami et al., 1998; Quaroni et al., 1999). De plus, les glucocorticoïdes augmenteraient le niveau de la caldesmon, une protéine importante dans l'organisation du cytosquelette d'actine où l'altération corrèle avec l'induction de la motilité (Murakami et al., 1998).

6. L'adhésion différentielle sur les laminines pour les cellules HIEC-6 exposées aux glucocorticoïdes et à l'EGF

Malgré l'homologie structurale des intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$, leur spécificité de liaison diffère l'une de l'autre (Tulla et al. 2001). Dans cette étude, il a été démontré que l'expression de ces isoformes pouvait être modulée en présence d'EGF et/ou de dexaméthasone. Par conséquent, cette modulation modifie la composition des intégrines à la surface cellulaire impliquant ainsi une altération des propriétés adhésives.

Les essais d'adhésion ont permis d'illustrer que les cellules traitées à l'EGF avaient une affinité de liaison beaucoup moins importante pour les laminines comparativement à celles traitées à la dexaméthasone. Ces observations corrélaient avec les résultats publiés par certains groupes de recherche démontrant que les glucocorticoïdes sont impliqués dans l'induction de l'adhésion focale (Leo et al., 2004; Koukouritaki et Lianos, 1999). D'autre part, les tests d'inhibition ont démontré que l'adhésion sur la laminine-1, en présence d'EGF, était faiblement médiée par l'intégrine $\alpha 2$. Considérant que ce facteur de croissance permet une augmentation significative de la sous-unité $\alpha 2$ et une réduction massive de la sous-unité $\alpha 1$, il aurait été logique que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ soit le récepteur principalement responsable de cette adhésion. Au contraire, l'inhibition de cette sous-unité n'a aucun effet sur l'affinité de liaison des cellules HIEC-6 aux laminines. Une diminution de l'adhésion cellulaire est observée seulement lorsque des anticorps bloquants sont utilisés contre les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ simultanément. Ces résultats semblent indiquer que l'affinité de liaison de l'intégrine $\alpha 1$ pour les laminines est très importante malgré sa faible expression dans les cellules HIEC-6 traitées à l'EGF. Pour la chaîne $\alpha 1$ des laminines, Etnner et al. ont démontré, en 1998, que l'affinité de liaison de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ était cinq fois plus importante que celle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Ainsi, la sous-unité $\alpha 2$ des intégrines semble jouer un rôle secondaire dans les interactions laminine dépendante.

Pour les cellules HIEC-6 traitées à la dexaméthasone, l'augmentation de l'adhésion cellulaire observée sur les laminines semble être relié, en partie, à l'expression accrue de la sous-unité $\alpha 1$ des intégrines. En effet, les analyses d'inhibition ont révélé une adhésion sur la laminine-1 qui était partiellement dépendante des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ où l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ semblait jouer le rôle principal. Toutefois, la présente étude a montré que l'action de l'EGF dominait sur les glucocorticoïdes pour l'expression des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Ceci dit, lorsque les cellules HIEC-6 sont exposées aux deux facteurs, l'adhésion cellulaire résultante est semblable à celle des cellules exposées uniquement aux glucocorticoïdes, malgré l'altération du répertoire des intégrines de surface. Par conséquent, ces faits incitent à rejeter la sous-unité $\alpha 1$ comme inducteur principal dans l'établissement de cette interaction soutenue avec la matrice extracellulaire. D'autre part, l'utilisation de la laminine-2, isoforme cryptale prédominante dans l'épithélium intestinal adulte, a permis de mettre en évidence un mécanisme adhésif encore inconnu des cellules HIEC-6 traitées à la dexaméthasone. Cette mobilisation cellulaire s'effectue sans la participation des hémidesmosomes, une structure adhésive impliquant une interaction entre l'intégrine $\beta 4$ et les laminines puisque la sous-unité $\beta 4$ est non fonctionnelle chez les cellules HIEC (Basora et al., 1999). Contrairement à la laminine-1, l'adhésion cellulaire à la laminine-2 révèle une certaine indépendance aux intégrines de types $\beta 1$. Dans ce cas, il serait possible que la dexaméthasone induise l'expression d'autres récepteurs spécifiques à la laminine-2. En effet, il a été démontré dans cette étude que la dexaméthasone pouvait moduler la

sous-unité $\alpha 6$ des intégrines. De même, les récepteurs de types héparane sulfate et le dystroglycan pourrait également contribuer à cette adhésion puisque l'héparine a peu d'effet inhibiteur sur la laminine-2 (Pall et al., 1996). En plus des intégrines et du dystroglycan, la laminine-2 peut interagir avec le récepteur 1 des laminines (laminin receptor 67-KD; Ribosomal protein SA) (Belkin and Stepp, 2000; Shmakov et al., 2000; Patarroyo et al., 2002). Ainsi, l'utilisation de la technologie des puces d'ADN pourrait apporter des informations pertinentes pour l'identification de gènes susceptibles d'être associé à ce mécanisme adhésif encore mal défini.

Dans un contexte physiologique, les glucocorticoïdes pourraient favoriser la séquestration des cellules clonogéniques dans le compartiment cryptal, entre la 16^e et 20^e semaine de vie foetale, par un ancrage soutenu à la laminine-2. En effet, les glucocorticoïdes serait impliqués dans la régulation de la migration cellulaire et le maintien des structure épithéliales (Murakami et al., 1998). Pour supporter cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer des tests de migration cellulaire en présence ou non de l'hormone.

6.1. Adhésion différentielle et glucocorticoïdes: mécanismes intrinsèques

La présence d'intégrines actives à la surface cellulaire résulte de la contribution de différents mécanismes de régulation qui permettent la fluctuation des niveaux protéiques, la mobilisation de réserves intracellulaires préexistantes et le changement conformationnel des récepteurs membranaires

(Kim and Yamada, 1997). Le contrôle bidirectionnel de cette activation permet de suspecter l'implication des protéines intracellulaires dans l'augmentation de l'avidité en présence des glucocorticoïdes. L'action biologique de cette hormone active des récepteurs intracellulaires qui agissent comme des facteurs de transcription ligand-dépendant (Pujols et al., 2002). Ainsi, la dexaméthasone pourrait affecter les niveaux d'expression d'autres groupes protéiques capables d'interagir avec la portion cytoplasmique des intégrines et permettre l'accroissement de l'adhésion focale (Leo et al., 2004; Koukouritaki et lianos, 1999). La taline et l' α -actinine peuvent s'associer directement avec la queue cytoplasmique des intégrines et augmenter leur affinité de liaison pour un ligand via un changement conformationnel (Hemler, 1998; Carman and Springer, 2003; Nayal et al., 2004).

D'autre part, une redistribution membranaire des récepteurs pourrait également contribuer à l'adhésion différentielle par une hausse du regroupement des intégrines (Calderwood, 2004; Wozniak et al., 2004). De même, la localisation des intégrines au sein de microdomaines spécialisés, nommés « lipid rafts », pourrait altérer les propriétés adhésives des récepteurs (Decker et al., 2004). Les glucocorticoïdes, quant à eux, ont la capacité de modifier la composition protéique et lipidique de ces microdomaines (Van Laethem et al., 2003). Ainsi, la présence de dexaméthasone dans le milieu de culture des cellules HIEC-6 pourrait accentuer le regroupement des intégrines via une relocalisation dans les « lipid rafts ». Les associations de certaines

intégrines avec d'autres protéines membranaires peuvent également modifier l'avidité des récepteurs. Ainsi, l'association de CD98, un transporteur d'acides aminés, avec la sous-unité $\beta 1$ des intégrines est un exemple éloquent de ce mécanisme (Warren et al., 2000; Fenczik et al., 1997).

7. Adhésion et survie cellulaire

L'analyse des comportements adhésifs et morphologiques des cellules HIEC-6 exposés aux facteurs de croissance a permis de mettre en lumière certaines réponses cellulaires. En effet, l'adhésion long terme, sur la laminine-2, des cellules intestinales traitées à l'EGF a démontré un taux d'adhésion très faible comparativement aux autres conditions. Dans ce contexte particulier, la manifestation de « blebbing » membranaire, événement caractéristique du processus d'apoptose, a également été observée. Récemment, une autre forme de mort cellulaire programmée a été mise en évidence, l'IMD (integrin-mediated death), qui se distingue de l'anoïkose (Stupack et al., 2001). Cette apoptose ne résulte pas d'une perte d'adhésion cellulaire et peut être activée par l'inhibition d'une seule intégrine (Stupack et Cheresch, 2002; Miranti et Brugge, 2002). Ainsi, la forte densité d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface cellulaire, induite par l'EGF, ne permettrait pas de supporter l'adhésion des cellules HIEC-6 sur la laminine-2. Cette observation est appuyée par l'étude de Buda et al., en 2003, rapportant que la réduction de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, à la surface des cellules intestinales, par le butyrate n'affecte pas l'adhésion laminine-dépendante. Par conséquent, cette faible avidité des cellules HIEC-6 pour la

matrice causerait l'apparition de symptôme apoptotique. D'autre part, lorsque les cellules HIEC-6 traitées à l'EGF sont ensemencées sur une matrice de collagène, ces manifestations biologiques disparaissent. En effet, la sous-unité $\alpha 2$, un récepteur de collagène, pourrait permettre l'adhésion et l'étalement des cellules HIEC-6 contribuant ainsi à leur survie cellulaire. Ainsi, ces résultats semblent suggérer que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne serait pas un récepteur important pour la laminine-2.

8. Rôle potentiel des récepteurs de type laminine dans l'établissement de la niche des cellules souches intestinales humaines : modèle hypothétique.

L'intégration des résultats obtenus dans un contexte physiologique, celui du développement, permet l'élaboration d'un modèle hypothétique concernant l'établissement de la niche cellulaire souche intestinale. Par conséquent, la formation de ce compartiment spécialisé couvre la période morphogénique des cryptes intestinales.

Selon ce modèle, la genèse de la niche débiterait par la chute du niveau des récepteurs EGF dans l'épithélium intestinal, vers la 14^e semaine de vie fœtale, atténuant du même coup l'effet répresseur du facteur de croissance épidermique sur l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$. Au même moment, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, avec l'aide de metalloprotéinases, permettrait l'invasion graduelle des cellules épithéliales dans le mésenchyme sous-jacent. À la 16 semaine, la

présence accrue de la sous-unité $\alpha 1$, au domaine basolatérale de l'épithélium cryptal en formation, faciliterait le recrutement de la laminine-2 à la membrane basilaire péricryptale. De même, l'expression du dystroglycan, un récepteur de la laminine-2, procéderait à la sélection des cellules prolifératives indifférenciées et favoriserait leur localisation dans les cryptes intestinales. L'augmentation graduelle des glucocorticoïdes circulant à partir de cette période, augmenterait davantage l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ qui à son tour régulerait négativement certain processus biologique opéré par l'intégrine $\alpha 2$. Cette hormone permettrait également la mise en place d'un mécanisme adhésif additionnel afin de permettre l'ancrage soutenu des cellules clonogéniques. Ainsi, entre la 18^e-20^e semaine, le processus morphogénique maintenant complété, laisserait place à un compartiment cryptal comparable à celui de l'intestin grêle adulte, avec une niche cellulaire souche confinée au tiers inférieur.

V - CONCLUSION

Les résultats obtenus, au cours de cette étude, ont apporté certaines réponses quant au patron d'expression des intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$, à leur mode de régulation par des morphogènes important du développement intestinal ainsi qu'à l'impact de cette régulation sur le potentiel adhésif des cellules intestinales humaines indifférenciées. De même, ces analyses ont permis de mettre en évidence un mécanisme adhésif intégrine indépendant encore inconnu. Ces travaux ont également révélé la présence du dystroglycan, un récepteur membranaire, dont l'expression co-localise parfaitement avec la laminine-2, dans la muqueuse intestinale humaine.

L'ensemble de ces nouvelles connaissances suggèrent que ces récepteurs seraient tous impliqués, à différents niveaux, dans l'établissement de la niche cellulaires souche intestinale humaine via leurs interactions avec la matrice extracellulaire. De même, ce processus serait régulé par deux facteurs morphogénique, l'EGF et les glucocorticoïdes.

En perspective, ce projet laisse plusieurs questions sans réponse dont le rôle fonctionnel des intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ ainsi que celui du dystroglycan. D'autre part, il serait intéressant d'identifier le mécanisme adhésif qui est induit par les glucocorticoïdes et responsable de l'adhésion différentielle sur les laminines.

REMERCIEMENT

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr Jean-François Beaulieu pour son support, sa confiance et ce petit quelque chose qui nous incite à repousser nos limites. Je tiens également à le remercier pour m'avoir initié à ce monde fascinant qu'est la recherche fondamentale. Dans cet univers, les voies sont pavées par la créativité et le hasard, nous menant parfois vers des destinations inconnues.

J'aimerais également remercier les assistants de recherche Élisabeth Herring et Rémi Gauthier, les étudiants du laboratoire ainsi que le personnel du département d'anatomie et biologie cellulaire sans qui l'aventure n'aurait pas été aussi agréable et enrichissante.

Je tiens à remercier les docteurs Daniel Ménard et Luc Gaudreau pour avoir accepté de réviser ce mémoire.

Finalement, je voudrais remercier ma mère pour son soutien, ses encouragements et pour ce qu'elle est, un modèle extraordinaire de courage et de tenacité. Un gros merci à toute ma famille pour le réconfort et les moments d'évasions. Je tiens également à remercier mon copain David pour m'avoir épaulé, rassuré et encouragé tout au long de mes études universitaires et encore plus...

BIBLIOGRAPHIE

- Abramovich D.R. (1970) Fetal factors influencing the volume and composition of liquor amnii. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 77(10):865-877
- Albelda S.M. et Buck C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4(11):2868-2880
- Arsenault P. et Ménard D. (1985) Influence of hydrocortisone on human fetal small intestine in organ culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:893-901
- 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
- Bach S.P., Renehan A.G. et Potten C.S. (2000) Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21(3):469-476
- Battle E., Henderson J.T., Beghtel H., van den Born M.M., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., van de Wetering M., Pawson T. and Clevers H. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111(2):251-263
- Basora N., Herring-Gillam F.E., Boudreau F., Perreault N., Pageot L.P., Simoneau M., Bouatrouss Y. et Beaulieu J.F. (1999) Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J Biol Chem* 274(42):29819-29825
- Basson M.D., Modlin I.M. et Madri J.A. (1992) Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* 90(1):15-23
- Basson MD, Emenaker NJ, Sanders MA. (2000) Alpha integrin subunits regulate human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation and phenotype. *Cell Physiol Biochem* 10(1-2):27-36
- Beato M. et Klug J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3):225-236

- Beaulieu J.F. et Calvert R. (1984) Effect of dexamethasone on the fetal mouse small intestine in organ culture. *Anat Rec* 210(1):61-71
- Beaulieu J.F., Ménard D. et Calvert R. (1985) Influence of epidermal growth factor on the maturation of the fetal mouse duodenum in organ culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4(3):476-481
- Beaulieu J.F. et Calvert R. (1987) Hormonal regulation of epithelial cell proliferation in the fetal mouse duodenum in vitro. *Anat Rec* 217(3):250-255
- 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 (Pt 3):427-436
- Beaulieu J.F. et Vachon P.H. (1994) Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* 106(4):829-839
- Beaulieu J.F. (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31(4):1-78
- Beaulieu J.F. (1999) Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 4:D310-321
- Belkin V.M., Belkin A.M. et Koteliansky V.E. (1990) Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J Cell Biol.* 111(5 Pt 1):2159-2170
- Belkin A.M. et Stepp M.A. (2000) Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51(3):280-301
- Bevins C.L. (2004) The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 20(6):572-580
- Bonkhoff H. et Remberger K. (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28: 98-106
- Booth C. et Potten C.S. (2000) Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105(11):1493-1499
- Bouatrouss Y., Herring-Gillam F.E., Gosselin J., Poisson J. et Beaulieu J.F. Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* 156(1):45-50

Brittan M. et Wright N.A. (2004) Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 53:899-910

Brockington M., Blake D.J., Prandini P., Brown S.C., Torelli S., Benson M.A., Ponting C.P., Estournet B., Romero N.B., Mercuri E., Voit T., Sewry C.A., Guicheney P. et Muntoni F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 69(6):1198-1209

Brook F.A. et Gardner R.L. (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11):5709-5712

Buda A., Qualtrough D., Jepson M.A., Martines D., Paraskeva C. et Pignatelli M. (2003) Butyrate downregulates alpha2beta1 integrin: a possible role in the induction of apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Gut* 52(5):729-734

Calderwood D.A., Tuckwell D.S., Eble J., Kuhn K. et Humphries M.J. (1997) The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem* 272(19):12311-12317

Calderwood D.A. (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* 117(Pt 5):657-666

Calvert R., Lehoux J.G., Arsenault P., Menard D. (1983) Extracts of rat amniotic fluid contain a potent inducer of intestinal crypt formation. *Anat Rec.* 205(1):27-37

Campos L.S., Leone D.P., Relvas J.B., Brakebusch C., Fässler R., Suter U. et French-Constant C. (2004) β 1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development* 131:3433-3444

Carman C.V. and Springer T.A. (2003) Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 15(5):547-556

Chailier P. et Ménard D. (1999) Ontogeny of EGF receptors in the human gut. *Front Biosci* 4: D87-101

Chen D., Roberts R., Pohl M., Nigam S., Kreidberg J., Wang Z., Heino J., Ivaska J., Coffa S., Harris R.C., Pozzi A. et Zent R. (2004) Differential expression of collagen- and laminin-binding integrins mediates ureteric bud and inner medullary collecting duct cell tubulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287(4):F602-F611

Cheng H. et Leblond C.P. (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141(4):537-561

Chen J., Diacovo T.G., Grenache D.G., Santoro S.A. and Zutter M.M. (2002) The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* 161(1):337-344

Chen J.D., Kim J.P., Zhang K., Sarret Y., Wynn K.C., Kramer R.H. et Woodley D.T. (1993) Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* 209(2):216-223

Clatworthy J.P. et Subramanian V. (2001) Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 101(1-2):3-9

Collins A.T., Habib F.K., Maitland N.J. et Neal D.E. (2001) Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* 114(21):3865-3872

Collins B.J., Gorelick G. et Schneider A.B. (2001) Dystroglycan is present in rat thyroid and rat thyroid cells and responds to thyrotropin. *Endocrinology* 142(7):3152-3162

Colognato H., MacCarrick M., O'Rear J.J. et Yurchenco P.D. (1997) The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J Biol Chem* 272(46):29330-29336

Colognato H. et Yurchenco P.D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218(2):213-234

Colony P.C. (1983) Successive phases of human fetal intestinal development. In *Nutritional adaptation of the gastrointestinal tract of the newborn*. Kretchmer N. et Minkowski A. (eds), Raven Press, New York, 3-28

Conteas C.N., DeMorrow J.M. et Majumdar A.P. (1986) Effect of epidermal growth factor on growth and maturation of fetal and neonatal rat small intestine in organ culture. *Experientia* 42(8):950-952

Cosgrove D., Rodgers K., Meehan D., Miller C., Bovard K., Gilroy A., Gardner H., Kotelianski V., Gotwals P., Amatucci A. et Kalluri R. (2000) Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157(5):1649-1659

Dalkilic I. et Kunkel L.M. (2003) Muscular dystrophies: genes to pathogenesis *Curr Opin Genet Dev* 13(3):231-238

Danen E.H. et Sonnenberg A. (2003) Integrins in regulation of tissue development and function *J Pathol* 201(4):632-641

Davies J.I. (1980) The foetal adrenal. In *Maternal-foetal endocrinology*. Tulchinsky D. et Ryan K.J. (ed), W.B. Saunders Compagny, Philadelphia: 242-251

De Arcangelis A. et Georges-Labouesse E. (2000) Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet* 16(9):389-395

Decker L., Baron W. and Ffrench-Constant C. (2004) Lipid rafts: microenvironments for integrin-growth factor interactions in neural development. *Biochem Soc Trans* 32(Pt3):426-430

De Santa Barbara P., van den Brink G.R., Roberts D.J. (2003) Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 60(7):1322-1332

Deschaseaux F., Gindraux F., Saadi R., Obert L., Chalmers D. et Herve P. (2003) Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45^{med,low} phenotype. *Br J Haematol* 122(3):506-517

Desloges N., Basora N., Perreault N., Bouatrouss Y., Sheppard D. et Beaulieu J.F. (1998) Regulated expression of the integrin alpha9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: relation with cell proliferation. *J Cell Biochem* 71(4):536-545

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(14):4008

Dontu G., Jackson K.W., McNicholas E., Kawamura M.J., Abdallah W.M. et Wicha M.S. (2004) Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 6(6):R605-615

- Duband J.L., Belkin A.M., Syfrig J., Thiery J.P. et Koteliensky V.E. (1992) Expression of alpha 1 integrin, a laminin-collagen receptor, during myogenesis and neurogenesis in the avian embryo. *Development* 116(3):585-600
- Durbeej M., Larsson E., Ibraghimov-Beskrovnyaya O., Roberds S.L., Campbell K.P. et Ekblom P. (1995) Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *J Cell Biol* 130(1):79-91
- Durbeej M., Henry M.D. et Campbell K.P. (1998) Dystroglycan in development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 10(5):594-601
- Durbeej M. et Campbell K.P. (1999) Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. *J Biol Chem* 274(37):26609-26616
- Durbeej M., Talts J.F., Henry M.D., Yurchenco P.D., Campbell K.P. et Ekblom P. (2001) Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* 69(2-3):121-134
- Eble J.A., Niland S., Dennes A., Schmidt-Hederich A., Bruckner P. et Brunner G. (2002) Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other alpha2beta1 integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol* 21(7):547-558
- Ekblom M., Falk M., Salmivirta K., Durbeej M. et Ekblom P. (1998) Laminin isoforms and epithelial development. *Ann N Y Acad Sci* 857:194-211
- Ekblom P., Lonai P. et Talts J.F. (2003) Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22(1):35-47
- Erickson A.C. et Couchman J.R. (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 48(10):1291-1306
- Erlandsen S.L., Parsons J. A. et Taylor T.D. (1974) Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man. *J Histochem Cytochem* 22:401-413.
- Ervasti J.M. et Campbell K.P. (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122(4):809-823
- Esapa C.T., Bentham G.R., Schroder J.E., Kroger S. et Blake D.J. (2003) The effects of post-translational processing on dystroglycan synthesis and trafficking. *FEBS Lett* 555(2):209-216

Ettner N., Gohring W., Sasaki T., Mann K. et Timpl R. (1998) The N-terminal globular domain of the laminin alpha1 chain binds to alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins and to the heparan sulfate-containing domains of perlecan. *FEBS Lett* 430(3):217-221

Fenczik C.A., Sethi T., Ramos J.W., Hughes P.E. and Ginsberg M.H. (1997) Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature* 390(6655):81-85

ffrench-Constant C. et Colognato H. (2004) Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 14(12):678-686

Fiorucci S., Mencarelli A., Palazzetti B., Sprague A.G., Distrutti E., Morelli A., Novobrantseva T.I., Cirino G., Kotliansky V.E. et de Fougères A.R. (2002) Importance of innate immunity and collagen binding integrin alpha1beta1 in TNBS-induced colitis. *Immunity* 17(6):769-780

Fujiya M., Watari J., Ashida T., Honda M., Tanabe H., Fujiki T., Saitoh Y. et Kohgo Y. (2001) Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res* 92(10):1074-1081

Ganz T. (2000) Paneth cells guardians of the gut cell hatchery. *Immunol Nature* 1(2):99-100

Gardner H., Kreidberg J., Kotliansky V. et Jaenisch R. (1996) Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* 175(2):301-113

Gardner H., Broberg A., Pozzi A., Laato M. et Heino J. (1999) Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):263-272

Gawlik K., Miyagoe-Suzuki Y., Ekblom P., Takeda S. et Durbeej M. (2004) Laminin alpha1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha2 chain deficient mice. *Hum Mol Genet* 13(16):1775-1784

Giancotti F.G. et Ruoslahti E. (1999) Integrin signalling. *Science* 285(5430):1028-1032

Girgenrath M., Dominov J.A., Kostek C.A. et Miller J.B. (2004) Inhibition of apoptosis improves outcome in a model of congenital muscular dystrophy. *J Clin Invest* 114(11):1635-1639

Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan AP., Blumenstock C. et Niehrs C. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391(6665):357-362

Glukhova M., Koteliansky V., Sastre X. et Thiery J.P. (1995) Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 146(3):706-716

Haas C., Gleason B., Lin S., Tramonti G. et Kanwar Y. (2004) Matrix metalloproteinases in renal development. *Connect Tissue Res* 45(2):73-85

Hagios C., Lochter A., Bissell M.J. (1998) Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1370):857-870

Haramis A.P., Begthel H., van den Born M., van Es J., Jonkheer S., Offerhaus G.J. et Clevers H. (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303(5664):1684-1686

Hata R., Hori H., Nagai Y., Tanaka S., Kondo M., Hiramatsu M., Utsumi N. et Kumegawa M. (1984) Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinology* 115(3):867-876

Hayashi Y.K., Ogawa M., Tagawa K., Noguchi S., Ishihara T., Nonaka I. et Arahata K. (2001) Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* 57(1):115-121

He X.C., Zhang J., Tong W.G., Tawfik O., Ross J., Scoville D.H., Tian Q., Zeng X., He X., Wiedemann L.M., Mishina Y. et Li L. (2004) BMP signalling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signalling. *Nat Genet.* 36(10):1117-1121

Heino J. (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* 19(4):319-323

Helbling-Leclerc A., Zhang X., Topaloglu H., Cruaud C., Tesson F., Weissenbach J., Tome F.M., Schwartz K., Fardeau M., Tryggvason K. et al. (1995) Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* 11(2):216-218

Hemler M.E. (1998) Integrin associated proteins *Curr Opin Cell Biol* 10(5):578-585

Henning SJ, Rubin DC, Shulman RJ. (1994) Ontogeny of the intestinal mucosa. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd ed. Johnson LR (ed), Raven Press, New York, 571-610

Henry M.D. et Campbell K.P. (1996) Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8(5):625-631

Hoffman M.P., Nomizu M., Roque E., Lee S., Jung D.W., Yamada Y. et Kleinman H.K. (1998) Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. *J Biol Chem* 273(44):28633-28641

Holt K.H., Crosbie R.H., Venzke D.P. et Campbell K.P. (2000) Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett* 468(1):79-83

Hong Y.K., Lange-Asschenfeldt B., Velasco P., Hirakawa S., Kunstfeld R., Brown L.F., Bohlen P., Senger D.R. et Detmar M. (2004) VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J.* 18(10) Epub 2004 May 7

Hotchin N.A., Gandarillas A. et Watt F.M. (1995) Regulation of cell surface β 1 integrin levels during keratinocytes terminal differentiation *J Cell Biol* 128 (6):1209-1219

Humphries M.J. (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28(4):311-339

Ibraghimov-Beskrovnyaya O., Milatovich A., Ozcelik T., Yang B., Koepnick K., Francke U. et Campbell K.P. (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet* 2(10):1651-1657

Itoh S., Itoh F., Goumans M.J. et Ten Dijke P. (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267(24):6954-6967

Jensen U.B., Lowell S. et Watt F.M. (1999) The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole labelling and lineage analysis. *Development* 126: 2409-2418

Johnson G.D. et Nogueira Araujo G.M. (1981) A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods* 43(3):349-350

Jones P.H. et Watt F.M. (1993) Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73(4): 713-724

Jones P.H., Harper S. et Watt F.M. (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80:83-93.

Kalluri R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3(6):422-433

Kanagawa M., Saito F., Kunz S., Yoshida-Moriguchi T., Barresi R., Kobayashi Y.M., Muschler J., Dumanski J.P., Michele D.E., Oldstone M.B. et Campbell K.P. (2004) Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell* 117(7):953-964

Karam S.M. (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 4:D286-D298

Karanu F.N., Murdoch B., Miyabayashi T., Ohno M., Koremoto M., Gallacher L., Wu D., Itoh A., Sakano S. et Bhatia M. (2001) Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human haematopoietic cells. *Blood* 97(7):1960-1967

Kaye G.I., Siegel L.F. et Pascal R.R. (1971) Cell replication of mesenchymal elements in adult tissues. II. Replication of smooth muscle cells in the colonic muscularis externa of adult rabbits. *Am J Anat* 132(1):93-102

Kedinger M., Simon-Assmann P. et Lacroix B. (1986) Development of the digestive function: regulation of the maturation of intestinal brush border enzymes. *Reprod Nutr Dev* 26(2B):691-702

Kedinger M, Duluc I, Fritsch C, Lorentz O, Plateroti M. et Freund J.N. (1998) Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions *Ann N Y Acad Sci.* 859 (17):1-17

Kim L.T. et Yamada K.M. (1997) The regulation of expression of integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 214(2):123-131

Kirchhofer D., Languino L.R., Ruoslahti E. et Pierschbacher M.D. (1990) Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem* 265(2):615-618

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(2):204-228

Kleinman H.K., Philp D. et Hoffman M.P. (2003) Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol.* 14(5):526-532

Klekotka P.A., Santoro S.A., Ho A., Dowdy S.F. et Zutter M.M. (2001) Mammary epithelial cell-cycle progression via the alpha(2)beta(1) integrin: unique and synergistic roles of the alpha(2) cytoplasmic domain. *Am J Pathol* 159(3):983-992

- Klekotka P.A., Santoro S.A., Wang H. et Zutter M.M. (2001) Specific residues within the alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain regulate migration and cell cycle progression via distinct MAPK pathways. *J Biol Chem* 276(34):32353-32361
- Korhonen M., Ylanne J., Laitinen L. et Virtanen I. (1990) The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol.* 111(3):1245-1254
- Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J. et Clevers H. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19(4):379-383
- Koukouritaki S.B. et Lianos EA. (1999) Glucocorticoid effect on human mesangial cell cytoskeletal proteins. *J Lab Clin Med* 133(4):378-383
- Koyama S.Y. et Podolsky D.K. (1989) Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 83: 1768-1773
- Lacroix B., Kedinger M., Simon-Assmann P. et Haffen K. (1984) Early organogenesis of human small intestine: scanning electron microscopy and brush border enzymology. *Gut* 25:925-930
- Langenbach K.J. et Rando T.A. (2002) Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve* 26(5):644-653
- Langholz O., Rockel D., Mauch C., Kozłowska E., Bank I., Krieg T. et Eckes B. (1995) Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 131(6 Pt 2):1903-1915
- Laprise P., Poirier E.M., Vezina A., Rivard N. et Vachon P.H. (2002) Merosin-integrin promotion of skeletal myofiber cell survival: Differentiation state-distinct involvement of p60Fyn tyrosine kinase and p38alpha stress-activated MAP kinase. *J Cell Physiol* 191(1):69-81
- Leblond C.P. The life history of cells in renewing systems. (1981) *Am J Anat.* 160(2):114-158
- Leblond C.P. et Inoue S. (1989) Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat* 185(4):367-390

Lefebvre O., Sorokin L., Kedinger M. et Simon-Assmann P. (1999) Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. *Dev Biol* 210(1):135-150

Lentze M.J., Colony P.C., Trier J.S. (1985) Glucocorticoid receptors in isolated intestinal epithelial cells in rats. *Am J Physiol* 249(1 Pt 1):G58-65

Leo J.C., Guo C., Woon C.T., Aw S.E. et Lin V.C. (2004) Glucocorticoid and mineralocorticoid cross-talk with progesterone receptor to induce focal adhesion and growth inhibition in breast cancer cells. *Endocrinology* 145(3):1314-1321

Leschziner A., Moukhles H., Lindenbaum M., Gee S.H., Butterworth J., Campbell K.P. et Carbonetto S. (2000) Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J Neurochem* 74(1):70-80

Li A., Simmons P.J. et Kaur P. (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):3902-3907

Li S., Harrison D., Carbonetto S., Fassler R., Smyth N., Edgar D. et Yurchenco P.D. (2002) Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* 157(7):1279-1290

Li S., Edgar D., Fassler R., Wadsworth W. et Yurchenco P.D. (2003) The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization *Dev Cell* 4(5):613-624

Li S., Liquari P., McKee K.K., Harrison D., Patel R., Lee S. et Yurchenco P.D. (2005) Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol* 169(1):179-189

Lickert H., Domon C., Huls G., Wehrle C., Duluc I., Clevers H., Meyer B.I., Freund J.N. et Kemler R. (2000) Wnt/(beta)-catenin signalling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* 127(17):3805-3813

Liu D., Gagliardi G., Nasim M.M., Alison M.R., Oates T., Lalani E.N., Stamp GW. et Pignatelli M. (1994) TGF-alpha can act as morphogen and/or mitogen in a colon-cancer cell line. *Int J Cancer*. 56(4):603-608

- Lochter A., Werb Z. et Bissell M.J. (1999) Transcriptional regulation of stromelysin-1 gene expression is altered during progression of mouse mammary epithelial cells from functionally normal to malignant. *Matrix Biol* 18(5):455-467
- Loeser R.F., Carlson C.S. et McGee M.P. (1995) Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* 217(2):248-257
- Losasso C., Di Tommaso F., Sgambato A., Ardito R., Cittadini A., Giardina B., Petrucci T.C. et Brancaccio A. (2000) Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 484(3):194-198
- Lussier C., Basora N., Bouatrouss Y. et Beaulieu JF. (2000) Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* 51(2):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
- MacDonald T.T., Horton M.A., Choy M.Y. and Richman P.I. (1990) Increased expression of laminin/collagen receptor (VLA-1) on epithelium of inflamed human intestine. *J Clin Pathol* 43(4):313-315
- Marshman E., Booth C. et Potten C.S. (2002) The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays* 24:91-98
- Massague J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791
- Matsumura K., Chiba A., Yamada H., Fukuta-Ohi H., Fujita S., Endo T., Kobata A., Anderson L.V., Kanazawa I., Campbell K.P. and Shimizu T. (1997) A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 272(21):13904-13910
- Mattila E., Pellinen T., Nevo J., Vuoriluoto K., Arjonen A. et Ivaska J. (2005) Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* 7(1):78-85
- McMillan J.R., Akiyama M. et Shimizu H. (2003) Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 31(3):169-177
- Ménard D. et Arsenault P. (1985) Explant culture of human fetal small intestine. *Gastroenterology* 88(3):691-700

- Ménard D., Arsenault P. et Pothier P. (1988) Biologic effects of epidermal growth factor in human fetal jejunum. *Gastroenterology* 94:656-663
- Ménard D. et Pothier P. (1991) Radioautographic localization of epidermal growth factor receptors in human fetal gut. *Gastroenterology* 101(3):640-649
- 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
- Meredith J.E. Jr., Winitz S., Lewis J.M., Hess S., Ren X.D., Renshaw M.W. et Schwartz M.A. (1996) The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 17(3):207-220
- Merritt A.J., Potten C.S., Kemp C.J., Hickman J.A. Balmain A., Lane D.P., et Hall P.A. (1994) The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 54: 614-617
- Miner J.H. (1999) Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56(6):2016-2024
- Miner J.H. et Yurchenco P.D. (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255-284
- Miner J.H., Li C. et Patton B.L. (2004) Laminins alpha2 and alpha4 in pancreatic acinar basement membranes are required for basal receptor localization. *J Histochem Cytochem* 52(2):153-156
- Miranti C.K. and Brugge J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4(4):E83-90
- Montanaro F. et Carbonetto S. (2003) Targeting dystroglycan in the brain. *Neuron* 37(2):193-196
- Montgomery R.K., Mulberg A.E. et Grand R.I. (1999) Development of the human gastrointestinal tract: Twenty years of progress. *Gastroenterology* 116:702-731
- Moog F. (1979) Endocrine influences on the functional differentiation of the small intestine. *J Anim Sci* 49(1):239-249
- Mould A.P., Akiyama S.K. et Humphries M.J. (1996) The inhibitory anti-beta1 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):20365-20374

- Moxey P.C. et Trier J.S. (1978) Specialized cell types in the human fetal small intestine. *Anat Rec* 195: 463-482
- Murakami N., Fukuchi S., Takeuchi K., Hori T., Shibamoto S. et Ito F. (1998) Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells. *J Cell Physiol* 176(1):127-137
- Murphy B.E. et Diez d'Aux R.C. (1972) Steroid levels in the human fetus: cortisol and cortisone. *J Clin Endocrinol Metab* 35(5):678-683
- Murphy B.E. (1979) Cortisol and cortisone in human fetal development. *J Steroid Biochem* 11(1B):509-513
- Murphy B.E. (1981) Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: a role for cortisone in human fetal development. *J Steroid Biochem* 14(9):811-817
- Muschler J., Levy D., Boudreau R., Henry M., Campbell K. et Bissell M.J. (2002) A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. *Cancer Res* 62(23):7102-7109
- Nanthakumar, N.N. (2001) Regulation of functional development of the small intestine. In *Gastrointestinal functions*. E.E. Delvin et M.J. Lentze (ed), Nestlé Nutrition Workshop Series, Pediatric program, vol. 46, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphie, 39-58
- Nanthakumar N.N., Young C., Ko J.S., Meng D., Chen J., Buie T. et Walker W.A. (2005) Glucocorticoid responsiveness in developing human intestine: possible role in prevention of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1):G85-G92
- Nayal A., Webb D.J., Horwitz A.F. (2004) Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16(1):94-98
- Nevalainen T.J., Shah V.I., de Peralta-Venturina M. et Amin MB (2001) Absence of group II phospholipase A2, a Paneth cell marker, from the epididymis. *APMIS* 109(4): 295-298
- Niessen C.M., Hogervorst F., Jaspars L.H., de Melker A.A., Delwel G.O., Hulsman E.H., Kuikman I. et Sonnenberg A. (1994) The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res* 211(2):360-367
- Obata H., Hayashi K., Nishida W., Momiyama T., Uchida A., Ochi T. et Sobue K. (1997) Smooth muscle cell phenotype-dependent transcriptional regulation of the alpha1 integrin gene. *J Biol Chem* 272(42):26643-26651

Ouellette A.J. (1997) Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment. *Gastroenterology* 113: 1779-1784

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 Tech* 49(4):394-406

Pall E.A., Bolton K.M. et Ervasti J.M. (1996) Differential heparin inhibition of skeletal muscle alpha-dystroglycan binding to laminins. *J Biol Chem* 271(7):3817-3821

Panneerselvam M., Sahai A. et Salomon D.S. (1985) Modulation of type-IV procollagen and laminin production in A431 human squamous epidermoid carcinoma cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and epidermal growth factor (EGF). *Arch Dermatol Res* 277(5):377-383

Patarroyo M., Tryggvason K. and Virtanen I. (2002) Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12(3):197-207

Pavoni E., Sciandra F., Barca S., Giardina B., Petrucci T.C. et Brancaccio A. (2005) Immunodetection of partially glycosylated isoforms of alpha-dystroglycan by a new monoclonal antibody against its beta-dystroglycan-binding epitope. *FEBS Lett* 579(2):493-499

Perreault N., Vachon P.H. et Beaulieu J.F. (1995) Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Rec* 242(2):242-250

Perreault N. et Beaulieu J.F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224(2):354-364

Perreault N., Herring-Gillam E., Desloges N., Bélanger I., Pageot LP. et Beaulieu JF. (1998) Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 248(1):121-126

Pfaff M., Gohring W., Brown J.C. et Timpl R. (1994) Binding of purified collagen receptors (alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments. *Eur J Biochem* 225(3):975-984

Pichard V., Honore S., Kovacic H., Li C., Prevot C., Briand C. et Rognoni J.B. (2001) Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. *Histochem Cell Biol* 116(4):337-348

- Pinto D., Gregorieff A., Begthel H. et Clevers H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17(14): 1709-1713
- Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J. et Smith J.W. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275(29):21785-21788
- Polk D.B. et Barnard J.A. (1999) Hormones and growth factors in intestinal development. In *Development of the Gastrointestinal Tract*. Sanderson I.R. et Walker W.A. (ed), B.C. Decker Inc. Publisher, Hamilton, Canada.
- Porter E.M., Liu L., Oren A., Anton P.A. et Ganz T. (1997) Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect Immun* 65: 2389-2395
- Porter E.M., Bevins C.L., Ghosh D. et Ganz T. (2002) The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 59(1):156-170
- Pothier P. et Ménard D. (1988) Presence and characteristics of epidermal growth factor receptors in human fetal small intestine and colon. *FEBS Lett* 228(1):113-117
- Potten C.S. (1977) Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and irradiation. *Nature* 269: 518-521
- Potten CS, Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110(4):1001-1020
- Potten C.S., Booth C. et Pritchard D.M. (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int. J Exp Pathol* 78(4):219-243
- Potten C.S. (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1370):821-830
- Potten CS. (2004) Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* 161(2): 123-136
- Pozzi A., Wary K.K., Giancotti F.G. et Gardner H.A. (1998) Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo *J Cell Biol* 142(2):587-594
- Pozzi A., Moberg P.E., Miles L.A., Wagner S., Soloway P. et Gardner H.A. (2000) Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5):2202-2207

Pritchard J.A. (1966) Fetal swallowing and amniotic fluid volume. *Obstet Gynecol* 28(5):606-610

Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J., Torrego A., Xaubet A., Cidlowski J.A. et Picado C. (2002) Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(4):C1324-C1331

Quaroni A. (1985) Pre- and postnatal development of differentiated functions in rat intestinal epithelial cells. *Dev Biol* 111(2):280-292

Quaroni A. et Beaulieu J.F. (1997) Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 113(4):1198-1213

Quaroni A., Tian J.Q., Goke M. et Podolsky D.K. (1999) Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1):G1027-1040

Ratineau C., Duluc I., Pourreyron C., Kedinger M., Freund J.N. et Roche C. (2003) Endoderm- and mesenchyme-dependent commitment of the differentiated epithelial cell types in the developing intestine of rat. *Differentiation* 71(2):163-169

Renehan AG, Bach SP, Potten CS. (2001) The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol.* 15(3):166-176

Reya T., Duncan A.W., Ailles L., Domen J., Scherer D.C., Willert K., Hintz L., Nusse R. Et Weissman IL. (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423(6938):409-414

Roberts D.J., Smith D.M., Goff D.J. et Tabin C.J. (1998) Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut *Development* 125(15):2791-2801

Roberts D.J. (2000) Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn* 219(2): 109-120

Roberts S.A., Hendry J.H. et Potten C.S. (1994) Deduction of the clonogen content of intestinal crypts: a direct comparison of two-dose and multiple dose methodologies. *Radiat Res* 141: 303-308

Ronnlom A., Andersson S. et Danielsson A. (1998) Mechanisms of diarrhoea in myotonic dystrophy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10(7):607-610

Ronnbloom A., Danielsson A. et el-Salhy M. (1999) Intestinal endocrine cells in myotonic dystrophy: an immunocytochemical and computed image analytical study. *J Intern Med* 245(4):91-97

Ronnbloom A. et Danielsson A. (2004) Hereditary muscular diseases and symptoms from the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 39(1):1-4

Ryu J.S., Majeska R.J., Ma Y., LaChapelle L. et Guller S. (1999) Steroid regulation of human placental integrins: suppression of alpha2 integrin expression in cytotrophoblasts by glucocorticoids. *Endocrinology* 140(9):3904-3908

Sabatelli P., Columbaro M., Mura I., Capanni C., Lattanzi G., Maraldi N.M., Beltran-Valero de Barnabe D., van Bokoven H., Squarzoni S. et Merlini L. (2003) Extracellular matrix and nuclear abnormalities in skeletal muscle of a patient with Walker-Warburg syndrome caused by POMT1 mutation. *Biochim Biophys Acta*. 1638(1):57-62

Saelman E.U., Keely P.J. et Santoro S.A. (1995) Loss of MDCK cell alpha 2 beta 1 integrin expression results in reduced cyst formation, failure of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching morphogenesis, and increased apoptosis. *J Cell Sci* 1995 108 (Pt 11):3531-3540

Saito Y., Yamamoto T., Ohtsuka-Tsurumi E., Oka A., Mizuguchi M., Itoh M., Voit T., Kato Y., Kobayashi M., Saito K. et Osawa M. (2004) Fukutin expression in mouse non-muscle somatic organs: its relationship to the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 26(7):469-479

Salzman N.H., Chou M.M., de Jong H., Liu L., Porter EM. et Paterson Y. (2003) Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infection & Immunity*. 71(3): 1109-1115

Sampson N.S., Ryan S.T., Enke D.A., Cosgrove D., Koteliensky V. et Gotwals P. (2001) Global gene expression analysis reveals a role for the alpha 1 integrin in renal pathogenesis. *J Biol Chem* 276(36):34182-34188

Sancho E., Batlle E. et Clevers H. (2003) Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15(6):763-770

Sander G.R. et Powell B.C. (2004) Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. *J Histochem Cytochem* 52(4):509-516

Sasaki T., Fassler R., Hohenester E. (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164(7):959-963

Sawhney R.S., Zhou G.H., Humphrey L.E., Ghosh P., Kreisberg J.I., Brattain M.G. (2002) Differences in sensitivity of biological functions mediated by epidermal growth factor receptor activation with respect to endogenous and exogenous ligands. *J Biol Chem* 277(1):75-86

Scheele S., Falk M., Franzen A., Ellin F., Ferletta M., Lonaio P., Andersson B., Timpl R., Forsberg E. et Ekblom P. (2005) Laminin alpha1 globular domains 4-5 induce fetal development but are not vital for embryonic basement membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1502-1506

Schwartz M.A. et Assoian R.K. (2001) Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114(Pt 14):2553-2560

Senger D.R., Claffey K.P., Benes J.E., Perruzzi C.A., Sergiou A.P. et Detmar M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25):13612-13617

Sgambato A., Migaldi M., Montanari M., Camerini A., Brancaccio A., Rossi G., Cangiano R., Losasso C., Capelli G., Trentini G.P. et Cittadini A. (2003) Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am J Pathol* 162(3):849-860

Shimizu H., Hosokawa H., Ninomiya H., Miner J.H. et Masaki T. (1999) Adhesion of cultured bovine aortic endothelial cells to laminin-1 mediated by dystroglycan. *J Biol Chem* 274(17):11995-12000

Shmakov A.N., Bode J., Kilshaw P.J. and Ghosh S. (2000) Diverse patterns of expression of the 67-kD laminin receptor in human small intestinal mucosa: potential binding sites for prion proteins? *J Pathol* 191(3):318-322

Singh J., Itahana Y., Knight-Krajewski S., Kanagawa M., Campbell K.P., Bissell M.J. et Muschler J. (2004) Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res* 64(17):6152-6159

Simpson D.A., Feeney S., Boyle C. et Stitt A.W. (2000) Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 6:178-183

Simon P.M., Kedinger M., Raul F., Grenier J.F. et Haffen K. (1982) Organ culture of suckling rat intestine: comparative study of various hormones on brush border enzymes. *In vitro* 18:339-346

Simon-Assmann P.M., Kedinger M., Grenier J.F. et Haffen K. (1982) Control of brush border enzymes by dexamethasone in the fetal rat intestine cultured in vitro. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1(2):257-265

Simon-Assmann P., Lacroix B., Kedinger M. et Haffen K. (1986) Maturation of brush border hydrolases in human fetal small intestine maintained in organ culture. *Early hum. Dev.* 13:65-74

Simon-Assmann P., Duclos B., Orian-Rousseau V., Arnold C., Mathelin C., Engvall E. et Kedinger M. (1994) Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* 201(1):71-85

Simon-Assmann P., Kedinger M., De Arcangelis A., Rousseau V. et Simo P. (1995) Extracellular matrix components in intestinal development *Experientia* 51(9-10):883-900

Simon-Assmann P., Lefebvre O., Bellissent-Waydelich A., Olsen J., Orian-Rousseau V. et De Arcangelis A. (1998) The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859:46-64

Smirnov S.P., McDearmon E.L., Li S., Ervasti J.M., Tryggvason K. et Yurchenco P.D. (2002) Contributions of the LG modules and furin processing to laminin-2 functions. *J Biol Chem* 277(21):18928-18937

Solomon N.S., Gartner H., Oesterreicher T.J. et Henning S.J. (2001) Development of glucocorticoid-responsiveness in mouse intestine. *Pediatr Res* 49(6):782-788

Sorokin L.M., Conzelmann S., Ekblom P., Battaglia C., Aumailley M. et Timpl R. (1992) Monoclonal antibodies against laminin A chain fragment E3 and their effects on binding to cells and proteoglycan and on kidney development. *Exp Cell Res* 201(1):137-144

Stewart K., Monk P., Walsh S., Jefferiss C.M., Letchford J. et Beresford J.N. (2003) STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res* 313(3):281-290

Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S., Storgard C.M. and Cheresh D.A. (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155(3):459-470

Stupack D.G. and Cheresh D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115(Pt 19):3729-3738

Subramanian V., Meyer B. et Evans GS. (1998) The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 64(1):11-18

Suzuki N., Ichikawa N., Kasai S., Yamada M., Nishi N., Morioka H., Yamashita H., Kitagawa Y., Utani A., Hoffman M.P. et Nomizu M. (2003) Syndecan binding sites in the laminin alpha1 chain G domain. *Biochemistry* 42(43):12625-12633

Talts J.F. et Timpl R. (1999) Mutation of a basic sequence in the laminin alpha2LG3 module leads to a lack of proteolytic processing and has different effects on beta1 integrin-mediated cell adhesion and alpha-dystroglycan binding. *FEBS Lett* 458(3):319-323

Tanney D.C., Feng L., Pollock A.S. et Lovett D.H. (1998) Regulated expression of matrix metalloproteinases and TIMP in nephrogenesis. *Dev Dyn* 213(1):121-129

Teller I.C. et Beaulieu J.F. (2001) Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001:1-18

Teller I.C., Auclair J., Herring E., Ni H., Francoeur F., Virtanen I. et Beaulieu J.F. (2002) Expression and cellular origin of laminin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains in the developing human intestine. *Gastroenterology* 122(4) suppl.1:134A

Thomas J.O. et Kornberg R.D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7):2626-2630

Tian M., Jacobson C., Gee S.H., Campbell K.P., Carbonetto S. et Jucker M. (1996) Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8(12):2739-2747

Timpl R., Rohde H., Robey P.G., Rennard S.I., Foidart J.M. et Martin G.R. (1979) Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254(19):9933-9937

Timpl R. (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8(5):618-624

Timpl R. et Brown J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* 18(2):123-132

Tremblay E. et Ménard D. (1996) Differential expression of extracellular matrix components during the morphogenesis of human gastric mucosa. *Anat Rec* 245(4):668-676

- Tulla M., Pentikainen O.T., Viitasalo T., Kapyla J., Impola U., Nykvist P., Nissinen L., Johnson M.S. et Heino J. (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains J Biol Chem 276(51):48206-48212
- Tunggal P., Smyth N., Paulsson M. et Ott M.C. (2000) Laminins: structure and genetic regulation. Microsc Res Tech 51(3):214-227
- Turck N., Gross I., Gendry P., Stutzmann J., Freund J.N., Kedinger M., Simon-Assmann P. et Launay J.F. (2005) Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. Exp Cell Res 303(2):494-503
- Uchino M., Hara A., Mizuno Y., Fujiki M., Nakamura T., Tokunaga M., Hirano T., Yamashita T., Uyama E., Ando Y., Mita S. et Ando M. (1996) Distribution of dystrophin and dystrophin-associated protein 43DAG (beta-dystroglycan) in the central nervous system of normal controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. Intern Med 35(3):189-194
- Vachon P.H. et Beaulieu J.F. (1995) Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. Am J Physiol 268(5 Pt 1):G857-G867
- Vachon P.H., Loechel F., Xu H., Wewer U.M. et Engvall E. (1996) Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. J Cell Biol 134(6):1483-1497
- van der Flier A. et Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res 305(3):285-298
- Van Laethem F., Liang X., Andris F., Urbain J., Vandenbranden M., Ruyschaert J.M., Resh M.D., Stulnig T.M. et Leo O. (2003) Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma. J Immunol. 170(6):2932-2939
- Verma K.B.L. (1979) Development of mucosa of the human ileum. J Anat 128:513-521
- Visse R. et Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 92(8):827-839
- Vu T.H. et Werb Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev 14(17):2123-2133

- Wang H., Gai Q., Yang X., Li Z., Linders B., Santoro S.A. et Zutter M.M. (2000) Role of the alpha1 and alpha2 integrin cytoplasmic domains in cell morphology, motility and responsiveness to stimulation by the protein kinase C pathway. *Cell Adhes Commun* 7(4):281-297
- Warren A.P., Patel K., Miyamoto Y., Wygant J.N., Woodside D.G. et McIntyre B.W. (2000) Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation. *Immunology* 99(1):62-68
- Wary K.K., Mainiero F., Isakoff S.J., Marcantonio E.E. et Giancotti F.G. (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87(4):733-743
- Watt F.M. et Hogan B.L.M. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427-1430
- Weir M.L. et Muschler J. (2003) Dystroglycan: emerging roles in mammary gland function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(4):409-419
- White D.J., Puranen S., Johnson M.S. et Heino J. (2004) The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8):1405-1410
- White S.R., Wojcik K.R., Gruenert D., Sun S. et Dorscheid D.R. (2001) Airway epithelial cell wound repair mediated by alpha-dystroglycan. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(2):179-186
- Wiley H.S., Shvartsman S.Y. et Lauffenburger D.A. (2003) Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology. *Trends Cell Biol* 13(1):43-50
- Wilkinson D.G. (2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2001 2(3):155-164
- Williamson R.A., Henry M.D., Daniels K.J., Hrstka R.F., Lee J.C., Sunada Y., Ibraghimov-Beskrovnaya O. et Campbell K.P. (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet* 6(6):831-841
- Winder S.J. (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26(2):118-124
- Wiseman B.S., Sternlicht M.D., Lund L.R., Alexander C.M., Mott J., Bissell M.J., Soloway P., Itohara S. et Werb Z. (2003) Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* 162(6):1123-1133

- Withers H.R. et Elkind M.M. (1970) Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 17(3):261-267
- Wozniak M.A., Modzelewska K., Kwong L., Keely P.J. (2004) Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692(2-3):103-119
- Yamada H., Shimizu T., Tanaka T., Campbell K.P. et Matsumura K. (1994) Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett* 352(1):49-53
- Yamada H., Saito F., Fukuta-Ohi H., Zhong D., Hase A., Arai K., Okuyama A., Maekawa R., Shimizu T. et Matsumura K. (2001) Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet* 10(15):1563-1569
- Yamanaka I., Koizumi M., Baba T., Yamashita S., Suzuki T. et Kudo R. (2003) Epidermal growth factor increased the expression of alpha2beta1-integrin and modulated integrin-mediated signaling in human cervical adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 286(2):165-174
- Yang Q., Bermingham N.A., Finegold M.J. et Zoghbi H.Y. (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294(5549):2155-2158
- Zent R., Bush K.T., Pohl M.L., Quaranta V., Koshikawa N., Wang Z., Kreidberg J.A., Sakurai H., Stuart R.O. et Nigam S.K. (2001) Involvement of laminin binding integrins and laminin-5 in branching morphogenesis of the ureteric bud during kidney development. *Dev Biol* 238(2):289-302
- Zhang X., Cromwell J.W., Kunjummen B.D., Yee D. et Garcia-Aguilar J. (2003) The alpha2 and alpha3 integrins are required for morphologic differentiation of an intestinal epithelial cell line. *Surgery* 133(4):429-437
- Zhu A.J., Haase I. et Watt F.M. (1999) Signalling via β 1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6728-6733
- Zutter M.M., Santoro S.A., Staatz W.D. et Tsung Y.L. (1995) Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7411-7415
- Zutter M.M., Santoro S.A., Wu J.E., Wakatsuki T., Dickeson S.K. et Elson E.L. (1999) Collagen receptor control of epithelial morphogenesis and cell cycle progression. *Am J Pathol* 155(3):927-940