Université de Grenoble

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences- neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marjolaine Pelissier-Rota

Thèse dirigée par **Muriel Jacquier-Sarlin**

préparée au sein de **Grenoble Institut des Neurosciences**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Le stress et les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) : rôle anti-inflammatoire de la neurostimulation vagale (NSV)

Thèse soutenue publiquement le **17 décembre 2014**
devant le jury composé de :

Frédéric André
Maître de conférences, Marseille, Rapporteur
Michel Neunlist
Directeur de recherche INSERM 913, Nantes, Rapporteur
Catherine Ghezzi
Professeur des universités, Grenoble, Président
Muriel Jacquier-Sarlin
Maître de conférences, Grenoble, Directrice de thèse

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

Je n'ai pas échoué, j'ai trouvé dix mille moyens qui ne fonctionnent pas.
Albert EINSTEIN

Cette citation est celle qui m'a permis d'avancer malgré de nombreuses expériences infructueuses. C'est en écrivant mon manuscrit et les articles que je me suis rendue compte du travail effectué et de l'avancée de mon sujet.

Chers membres du jury, Catherine Ghezzi, Frédéric André et Michel Neunlist, merci d'avoir acceptés d'évaluer mon travail de thèse. Et merci par avance de votre patience pour la (bonne) centaine de pages de synthèse bibliographique !

« On sait jamais sur un malentendu ça peut marcher »-Jean-Claude Dusse-Les bronzés font du ski.
Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la confiance, le soutien du Dr Muriel Jacquier-Sarlin.
Notre rencontre et collaboration est née d'une phrase anodine lancé pendant mon M1 : « tu pourrais venir continuer tes recherches de DEB cette été au labo »...Muriel ne pouvait imaginer à cet instant que j'allais pousser les portes du laboratoire pour finir mon étude du 2,4 DCP et de faire ma place pour mon M2 et ma thèse.
Alors Merci Muriel d'avoir de façon anodine proposer ce stage ! Merci de t'être battue pour réaliser cette thèse dans un environnement adéquat, merci d'avoir soutenu mes envies d'enseignement, merci de m'avoir formée à la paillasse comme dans ma réflexion.

"Everyone who has never made a mistake has never tried anything new." Albert EINSTEIN
Le déroulement de ma thèse n'a pas été un long fleuve tranquille, il m'a demandé de forger (un peu plus) mon caractère, de travailler ma diplomatie et d'apprendre à demander de l'aide. Les enseignements n'auront pas été seulement scientifiques, cette étape initiatique m'aura formée en tant qu'individu.
Merci à tous ceux qui m'ont participé à ce projet:
Patrick Meresse pour sa confiance, Michelle et sa positive attitude, Marie-Lise pour son soutien technique et son amitié, Yvan et Anca pour avoir été des stagiaires formidables (plein d'avenir).
Merci à Julien, Jérem, Denis, Aaron, Balou pour les randonnées, les parties de squash, les (nombreuses) bouteilles de vin (partagées et appréciées) qui ont embelli ma vie grenobloise.
Merci à Sandrine, Dorian, Nanouk pour votre amitié et les balades (a pieds, à cheval) qui ont permis d'oxygéner mes neurones lors de ma rédaction.
Merci à mon époux et premier supporter (ex-æquo avec ma mère !) qui a accepté tous mes états d'âme.
Merci à mon comité de soutien : Maman et papa qui ont aiguisé ma curiosité depuis toute petite...et qui ont lu et corrigé mon introduction ! Mes beaux-parents pour leurs encouragements et leur tendresse.
Merci à Manu et Alice, mes compagnons de voyage, meilleurs amis : vous êtes le meilleur soutien que l'on puisse espérer, ce projet n'aura jamais vu le jour sans vous.
Et enfin une pensée à Jaune (qui n'aura pas supporté le stress de la rédaction), Ilao et Utopia : mes supers animaux de compagnie !

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Synthèse bibliographique 1

Chapitre I. le tube digestif 3

I. Fonction et structure du tube digestif 3

1) Fonction du tube digestif 3

2) Structure du tube digestif 3

3) Fonction et strucutre de l'intestin grêle 9

4) Fonction et strucutre du côlon 10

5) Epithélium du tube digestif 11

II. Structure et homéostasie de l'épithélium intestinal 13

1) Architecture de l'axe crypto-villositaire 13

a) Ontogenèse de l'épithélium intestinal 13

b) Le renouvellement de l'épithélium 15

c) Réparation de l'épithélium intestinal 15

2) Les cellules spécialisée 17

a) Cellules souches 17

b) Cellules absorbantes 23

c) Cellules sécrétrices de mucus ou caliciformes 24

d) Cellules entéro-endocrines 24

e) Cellules de Paneth 25

f) Cellules M 25

g) Cellules Tuft 25

3) Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le lignage cellulaire 27

III. L'autophagie : processus impliqué dans le maintien de l'homéostasie intestinale 31

1) Mécanismes moléculaires de l'autophagie 31

a) Mécanisme cellulaire sélectif 35

b) Mitophagie : Autophagie sélective des mitochondries 35

2) Les signaux inducteurs de l'autophagie 36

3) Autophagie et homéostasie cellulaire 38

4) Autophagie et inflammation 38

a) Régulation de la production de cytokines 38

b) Régulation de la réponse immunitaire adaptative 40

IV. Rôle de barrière : importance des systèmes d'adhérence 42

1) Les jonctions intercellulaires 42

a) Les jonctions serrées (JS) ou Zonula Occludens 42
b) Les desmosomes 43
c) Les jonctions communicantes 45
d) Les jonctions adhérentes (JA) ou Zonula Adherens 45
i. Interactions entre les cadhérines voisines : rôle du domaine extracellulaire 46
ii. Interactions du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine 47
iii. Interactions avec la β-caténine 47
iv. Interactions avec p120 caténine (p120ctn) 48
v. Interactions avec l'α-caténine 51
vi. Interactions avec les nectines 51
vii. Les jonctions adhérentes et homéostasie intestinale 52
viii. Régulation du désassemblage des jonctions adhérentes 53
2) Jonction cellule-matrice extracellulaire 57
a) La lame basale : une forme particulière de MEC 57
b) Les différents constituants de la lame basale 57
i. Les laminines 59
ii. Les intégrines 59
3) Cross-talk entre les différents systèmes d'adhérence 62
4) L'adhérence dans un contexte pathologique 63
a) L'expression des protéines des JA 63
i. Dans le cadre des MICI 63
ii. Dans le cadre du développement tumoral 63
b) L'adhérence MEC-cellule 65
V. Rôle du système nerveux dans le contrôle de la barrière 67
Chapitre II. Les pathologies digestives 68
I. Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) 68
1) Inflammation 70
a) La régulation des cellules immunitaires 70
b) Les modifications de l'épithélium 72
2) Etiopathologie 74
3) Diagnostique et marqueurs associés 78
4) Les modèles animaux d'inflammation digestive 80
II. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 83
III. La migration et l'invasion cellulaire 85
IV. Le cancer colorectal (CCR) 88
1) Le cancer : une pathologie multifactorielle 89
a) Le microbiote 89
b) Le régime alimentaire et le tabagisme 92
c) Le stress 92
d) La régulation génétique dans le développement du CCR 94
i. Instabilité génétique 94

ii. Instabilité épigénétique 96
2) Cancer et inflammation 96
a) Les régulateurs positifs de la cancérogenèse 97
b) Les régulateurs négatifs de la carcinogenèse 98
Chapitre III. Les stratégies thérapeutiques 100
I. Thérapies conventionnelles 100
II. Thérapies non conventionnelles 104
III. L'autophagie 107
IV. La voie cholinergique anti-inflammatoire 112
Chapitre IV. Rôle de la relation brain-gut dans les MICI 114
I. Le système CRFergique 114
1) Les ligands : CRF et urocortines (Ucn) 117
2) Expression et localisation des récepteurs CRFergiques 118
a) Expression 118
b) Distribution 119
3) Les voies de signalisation activées par le système CRFergique 121
4) Rôle du système CRFergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal 123
a) Le système CRFergique lors d'un stress 123
i. Le système CRFergique lors d'un stress aigu 123
ii. Le système CRFergique lors d'un stress chronique 123
b) Le système CRFergique et l'altération de la barrière épithéliale 124
i. Rôle de l'acétylcholine 125
ii. Rôle des mastocytes 125
ii. Signalisation au niveau des entérocytes 126
c) Le système CRFergique et l'inflammation 126
i. Inflammation et régulation du système CRFergique 127
ii. Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium 129
d) Implication du système CRFergique dans le cancer 131
i. Expressions dans les cancers 131
ii. Implication du système CRFergique dans la progression tumorale 132
II. Le système cholinergique 137
1) La stimulation du nerf vague 137
a) La voie cholinergique anti-inflammatoire 137
i. Origine historique 137
ii. La voie cholinergique anti-inflammatoire 139
iii. La neurostimulation vagale 141
b) Les récepteurs cholinergiques et leurs ligands 144
i. Les récepteurs muscariniques 144
ii. Les récepteurs nicotiniques 145
iii. Distribution des récepteurs cholinergiques 147

iv. Ligands 149
c) Rôle des récepteurs cholinergique dans l'homéostasoe intestinale 151
i. Transport ionique 151
ii. Système immunitaire 152
iii. Rôle protecteur des récepteurs nicotiniques dans les MICI 153
iv. Rôle oncogénique des récepteurs cholinergiques dans les cancers 155

Objectif de la thèse 162
Axe I. Etude du rôle du système CRFergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal 169

Présentation du travail 169

Matériel et Méthodes 174

Résultats 185

Discussion 199
Axe I. Etude du rôle de la voie cholinergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal 206

Résultats 209

Conclusions et Perspectives 243

Annexes 282

Liste des figures

Figure 1 Anatomie du tube digestif..... 2
Figure 2 Anatomie de la paroi intestinale..... 2
Figure 3 Le systéme nerveux entérique..... 4
Figure 4 Organisation détaillée des plexus nerveux de la paroi intestinale..... 4
Figure 5 Surface optimisée de l'épithélium intestinal..... 8
Figure 6 Morphogénèse de l'épithélium intestinal..... 12
Figure 7 Organisation de l'axe crypto-villositaire..... 14
Figure 8 Mécanisme de réparation de l'épithélium intestinal..... 16
Figure 9 Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal..... 18
Figure 10 Cellules spécialisées de l'épithélium intestinal..... 19
Figure 11 Les différentes cellules intestinales..... 19
Figure 12 Les différentes cellules intestinales..... 20
Figure 13 Localisation des cellules souches..... 22
Figure 14 Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le lignage cellulaire..... 26
Figure 15 Les différents types d'autophagie..... 30
Figure 16 Le mécanisme cellulaire de l'autophagie..... 32
Figure 17 L'autophagie, un mécanisme sélectif..... 34
Figure 18 La mitophagie, une mécanisme sélectif..... 34
Figure 19 Expression de l'autophagie dans la muqueuse du colon..... 37
Figure 20 Rôle de l'autophagie dans l'immunité adaptative..... 39
Figure 21 Les différents types de jonctions intercellulaires au niveau des cellules épithéliales intestinales..... 41
Figure 22 Structure des jonctions adhérentes..... 44
Figure 23 Régulation dynamique du taux de cadhérine membranaire : endocytose et recyclage 54
Figure 24 L'activité biologique des fragments de la E-cadhérine..... 56
Figure 25 Distribution des laminines le long de l'axe crypto-villositaire : importance dans la morphogénèse intestinale et la différenciation cellulaire..... 58
Figure 26 Rôle protecteur des cellules gliales entériques sur la barrière épithéliale intestinale.... 66
Figure 27 MICI et altération de la barrière épithéliale..... 69
Figure 28 Pathogénèse d'une MICI..... 71
Figure 29 Déséquilibre de la balance Treg/Th1/Th17 dans la MC..... 73
Figure 30 Facteurs génétiques et MICI..... 75
Figure 31 Les étapes de la migration..... 84
Figure 32 La progression tumorale..... 87
Figure 33 Les mutations et les voies de signalisation qui affectent l'initiation et la progression tumorale..... 87
Figure 34 Impact de l'alimentation sur les facteurs de risques de développer un cancer colorectal (CCR)..... 93
Figure 35 Représentation schématique des modifications de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose observées lors de l'inflamation et de la progression tumorale..... 95

Figure 36 Colostomie avant (A) et après (B) 6 mois de traitement avec la sirolimus (rapamycine)..... 108
Figure 37 La voie cholinergique anti-inflammatoire..... 111
Figure 38 L'axe hypothalamo pituitary adrenal (HPA)..... 113
Figure 39 Le système CRFergique..... 116
Figure 40 Représentation schématique de la voie cholinergique anti-inflammatoire..... 138
Figure 41 Le système (de Cyberonics) permettant la stimulation du nerf vague..... 140
Figure 42 Les différents récepteurs cholinergiques..... 143
Figure 43 Métabolisme de l'acétylcholine (ACh)..... 150
Figure 44 La signalisation sous-jacente à l'activation des M3 mAChRs..... 158
Figure 45 Rôle oncogénique des récepteurs nicotiniques lors d'une exposition chronique à leurs ligands..... 160
Figure 46 Les différentes fonctions des récepteurs α7 nAChR et α4β2..... 162
Figure 47 Expression et localisation du CRF2 dans les cellules épithéliales de rat..... 184
Figure 48 Expression protéique du CRF2 lors de la différenciation entérocytaire..... 186
Figure 49 Le CRF2 augmente la perméabilité épithéliale para-cellulaire et trans-cellulaire..... 188
Figure 50 Le CRF2 altère la localisation des jonctions adhérentes dans les cellules HT-29 CRF2-GFP..... 190
Figure 51 Influence de l'activation du CRF2 sur la perméabilité intestinale..... 192
Figure 52 Expression protéique de KLF4 pendant la différenciation des cellules Caco-2 et influence de l'Ucn3..... 192
Figure 53 Etude de l'AS de la phosphatase alcaline lors de la différenciation des cellules Caco-2..... 194
Figure 54 Influence de l'Ucn3 sur l'expression des transcriptions de DPPIV..... 195
Figure 55 Effet de l'Ucn3 sur l'expression protéique de DPPIV lors de la différenciation des cellules Caco-2..... 195
Figure 56 Etude de l'activité spécifique de la DPPIV au cours de la différenciation des cellules Caco-2..... 196
Figure 57 Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral du CRF2..... 200
Figure 58 La voie cholinergique anti-inflammatoire..... 207
Figure 59 Système CRFergique et perte des contacts intercellulaires..... 267
Figure 60 La signalisation du système CRFergique..... 269
Figure 61 Ying et yang..... 274
Figure 62 Les voies activées par les nAChRs..... 276
Figure 63 Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral du CRF2 et des mAChRs..... 278

Liste des tableaux

Tableau 1	Les facteurs environnementaux influant sur le développement d'une MICI	77
Tableau 2	Les biomarqueurs communs des MICI	79
Tableau 3	Diagnostiquer une MICI	81
Tableau 4	Activité anti-cancéreuse des probiotiques	91
Tableau 5	Les 5-aminosamicylés	99
Tableau 6	Les corticoïdes	99
Tableau 7	Les immunosuppresseurs	101
Tableau 8	Les thérapies biologiques : anti-TNFα	103
Tableau 9	La chirurgie	103
Tableau 10	Les gènes impliqués dans l'autophagie susceptibles d'être mutés dans les MICI	105
Tableau 11	Distribution du système CRFergique dans l'intestin grêle	120
Tableau 12	Distribution du système CRFergique dans le côlon	122
Tableau 13	Distribution et expression des différents sous-types de récepteurs muscariniques au niveau de l'intestin humain	146
Tableau 14	Distribution et expression des différents sous-types de récepteurs nicotiniques au niveau de l'intestin humain	148
Tableau 15	Effets biologiques de la nicotine sur plusieurs processus biologiques selon la concentration	164
Tableau 16	Différenciation et caractéristiques phénotypiques de modèles cellulaires	173
Tableau 17	Anticorps utilisés	178
Tableau 18	Amorces utilisées lors des RT-PCR	180

Abréviations

5-HT	Sérotonine
5-ASA	5-aminosalicylé
6-MP	6-mercaptopurine
A	Adrénaline
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinesterase
AChRs	Récepteur cholinergique
ACTH	Hormone adrenocorticotrope
ADA	Adalimumab
ADAM	A distintegrin and metalloprotease
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Adhérences focales
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
ANCA	Anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques
AOM	Azoxyméthane
apoA-IV	Apoprotéine A IV
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASCA	Anticorps anti-saccharomycete cerivisiae
Atg	Protéine de l'autophagie
ATG	Gène de l'autophagie
AZA	Azathioprine
BECN1	Beclin-1
CAC	Cancer colorectal associé aux colites
CBC	Columnar crypt based cells
CBD	Catenin-binding domain
CCR	Cancer colorectal
CDT	Toxine de distension cytholétale
CGE	Cellule gliales entériques
ChAT	Acétylcholintransferase
CLASP	Cytoplasmic linker associated protein
CMA	Protéines chapronnes
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
COX-2	cyclooxygénase-2
CRF	Corticotropin releasing factor
CRP	Protéine C-réactive
CSA	Cyclosporine
C-term	domaine C-terminal
CTF	Fragment C-terminal intracellulaire
CZP	Certolizumab pegol
Dkk1	Dickkopf1
Dll4	Delta-like 4
Dns-C_6-Ch	Dansyl-C6-Choline
DSS	Dextran sodium sulfate
EC	Ectodomaine
EC	Extracellular repeats domain
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Récepteur à l'EGF
FAE	Follicule associated epithelium
FAK	Focal adhesion kinase
FCA	Focus de cryptes aberrantes
FDA	Food and drug administration
FGF2	Facteur de croissance fibroblasmique
GC	Glucocorticoïde
GEF	Guanine exchange factor
GF	Germ free
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Glis2	Gli-similar protein
GRK	G protein coupled-receptor kinase
HAV	His-Ala-Val
HD	Hemidesmosome
HGF	Hepatocyte growth factor
Hh	Hedgehog
HNF	Hepatic nuclear factor
HPA	hypothalamo pituitary adrenal
IEC	Cellule épithéliale intestinale
IFABP	Intestinal fatty acid binding protein
IFX	Infliximab
Ig	Immunogmobuline
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukine
ILK	Integrin linked kinase
INC	Instabilité génétique
INF	Intereferon
IQ	2-amino-3-methyl-3H-imidazol[4, 5-f]quinoline
JA	Jonctions adhérentes
JAK	Janus kinase
JAM	Junctional Adhesion molecule
JMD	Domaine juxtamembranaire
JS	Jonctions serrées
LAB	Lactic acid bacteria
LAMC2	Laminin-5γ-2
LB	Lymphocyte B
LC3	Light chain 3
LN	Laminine
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
M3 mAChR	Récepteur muscarinique de sous-type M3
mAChR	Récepteur muscarinique

MC	Maladie de Crohn
MEC	Matrice extracellulaire
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MMP	Métalloprotéases
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloprotease
MTX	Methotrexate
NA	Noradrénaline
nAChR	récepteur nicotinique
NCID	Notch intra-cellular domain
NK	Natural killer
NNK	4-methulnitrosamine-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	N-nitrosonornicotine
NSV	Neurostimulation vagale
NTF	Fragment N-terminal extracellulaire
NZA	Natalizumab
OVA	Ovalbumine
p120ctn	p120 caténine
PAMPs	Patogen associated molecular patterns
PE	Phosphatyléthanolamine
PGE_2	Prostaglandine E2
PI3p	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PLC	Phospholipase C
POZ-ZF	Pox virus and zinc-finger
PSEN1	preseniline
PTPN2	T cell protein tyrosine phosphate non-receptor type 2
RCH	Rectocolique hémorragique
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S100-β	S100 ca^{2+} binding protein β
SAIF	Saccharomyces anti-inflammatory factor
Sb	Saccharomyces boulardii
sE	Semaine embryonnaire
Shh	Sonic hedgehog
SLURP	Secreted lymphocyte antigen-6/urokinase type plasminogen activate related peptide
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
TEM	Transition épithelio-mésenchymateuse
TFF	Trefoil factor
TGF-α	Transforming growth factor alpha
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Toll like receptor
TNBS	Acide trinitrobenzène suflonique
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
Trp2	Triptophane
TSC1-2	Tuberous sclerosis complex 1-2
Ucn	Urocortine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vaso-intestinal peptide
Wnt	Wingless type
ZO	Zonula occludens
α7 nAChR	Récepteur nicotinique de sous type α7
α-caténine	Alpha-caténine
β-caténine	Béta-caténine

Synthèse bilbiographique

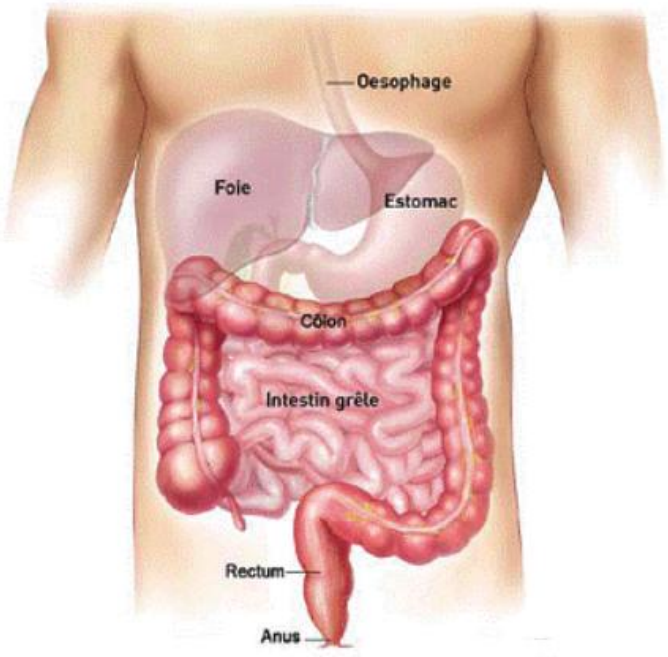


Figure 1. Anatomie du tube digestif.

L'intestin est divisé en deux parties, l'intestin grêle et le côlon. Au niveau de l'intestin grêle, on trouve successivement le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est constitué de plusieurs segments, le caecum puis le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le sigmoïde.

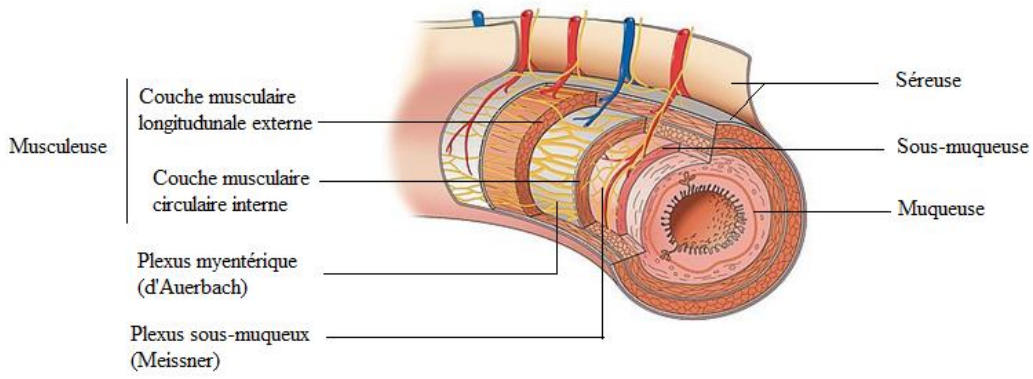


Figure 2. Anatomie de la paroi intestinale.

Le tube digestif est composé de quatre tuniques distinctes successives. De la lumière vers la couche externe du tube digestif , on observe : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse.

Chapitre I. le tube digestif

Synopsis :

Le tube digestif : 4 feuillets distincts : muqueuse, sous-muqueuse, musculeuse, séreuse
Présence de deux plexus nerveux (système nerveux entérique)
Double fonction : digestion et barrière
Renouvellement rapide et constant
Autophagie : maintien de l'homéostasie par dégradation des organites endommagés ; mécanisme sélectif
2 types d'adhérence : cellule-cellule et cellule-matrice extra cellulaire pour assurer le maintien de la barrière épithéliale
Altération de la barrière dans diverses pathologies digestives comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et les cancers.

I. Fonction et structure du tube digestif

1) Fonction du tube digestif

Le tube digestif peut être illustré comme une chaîne de démontage des aliments dont la fonction physiologique majeure est de digérer, d'extraire les nutriments présents dans le bol alimentaire ainsi que d'éliminer les éléments non assimilables. Ces processus débutent dès l'entrée des aliments dans la bouche par la mastication où les aliments mâchés se mélangent à la salive pour former le bol alimentaire. Grâce à la déglutition, ce dernier suit sa progression dans l'œsophage puis dans l'estomac où il est transformé en chyme. Les éléments assimilables seront absorbés dans l'intestin, les déchets seront excrétés lors de la défécation (figure 1).

2) Structure du tube digestif

Le tube digestif est formé par l'assemblage de quatre tuniques distinctes successives dont la disposition est conservée sur l'axe primo-distal (figure 2). De la couche externe du tube

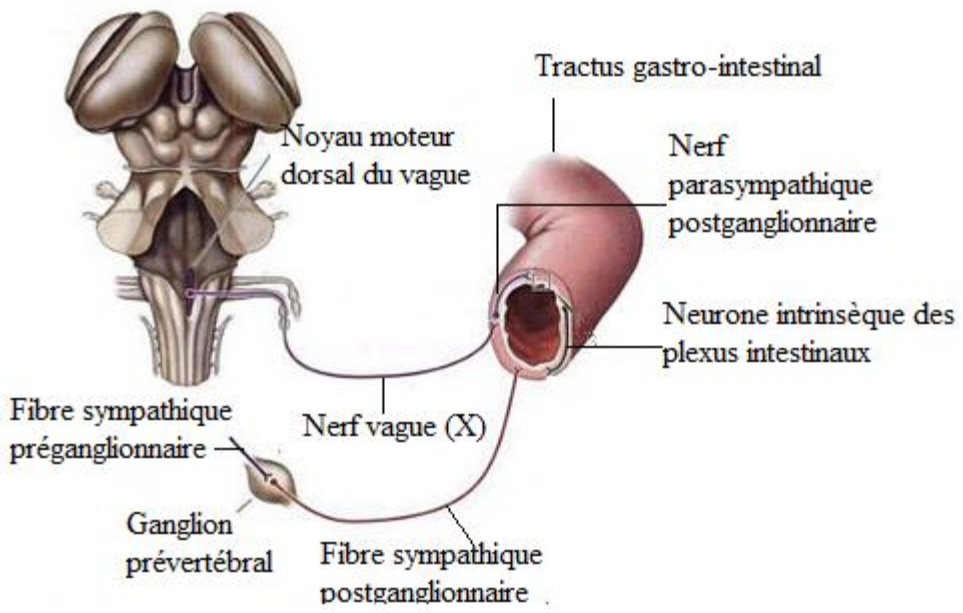


Figure 3. Le système nerveux entérique.

Innervation sympathique et parasympathique du système nerveux entérique et neurones intrinsèques de l'intestin.
D'après Neurosciences de Purves, 3ième édition.

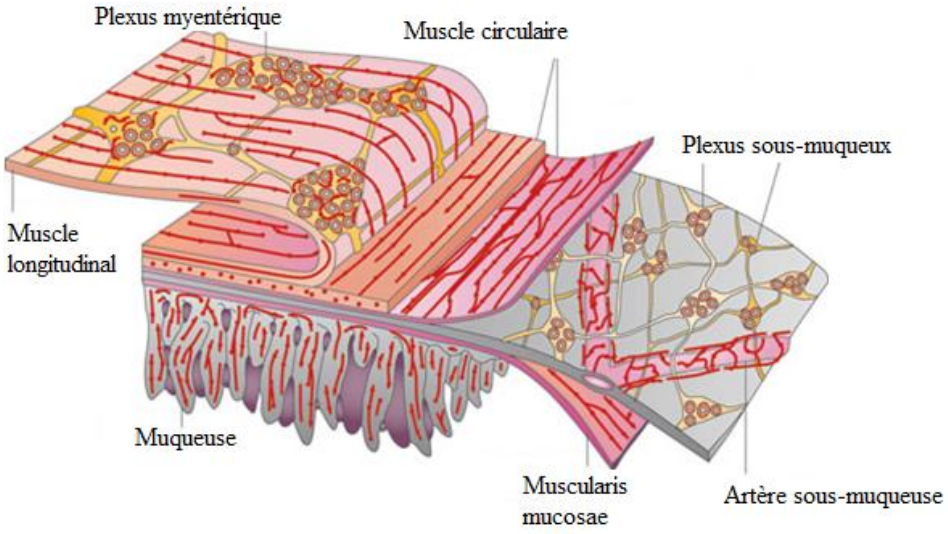


Figure 4. Organisation détaillée des plexus nerveux de la paroi intestinale.

Les neurones du plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) interviennent dans les activités sécrétoires de l'intestin, ceux du plexus myentérique (plexus d'Auerbach) dans les activités motrices (par exemple le péristaltisme).
D'après Furness, 2012.

digestif vers la lumière, on observe : la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse.

1) la séreuse (ou péritoine) est la couche la plus externe, elle enveloppe et distribue les entrées et sorties des systèmes nerveux, sanguin et lymphatique en provenance du mésentère. Elle a un rôle protecteur.

2) la musculeuse est composée d'un feuillet longitudinal externe et d'un feuillet circulaire interne de fibres musculaires lisses. La contraction autonome de ces dernières permet le mouvement péristaltique assurant le transit du bol alimentaire.

3) la sous-muqueuse est un tissu conjonctif lâche qui renferme des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des follicules lymphatiques et des fibres nerveuses.

4) la muqueuse intestinale est constituée de trois couches successives :

i) la *muscularis mucosae* composée de deux couches fines de muscles lisses, la longitudinale externe et circulaire interne.

ii) la *lamina propria*, aussi appelée chorion, est un tissu conjonctif riche en capillaires sanguins et lymphatiques. Cette couche héberge de nombreuses cellules immunitaires telles que les mastocytes et les macrophages.

iii) l'épithélium intestinal, repose sur le chorion. Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales polarisées reposant sur une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée appelée lame basale. Elle est sécrétée par les cellules du mésenchyme et les cellules épithéliales elles-mêmes (Marieb E.N, 2010).

Le tube digestif possède son propre système nerveux (figure 3), le système nerveux entérique (SNE) également appelés système nerveux intrinsèque. Il fonctionne de façon autonome mais il est malgré tout sous l'influence du système nerveux central (SNC).

Le SNE est organisé en deux plexus nerveux qui s'étendent tout le long du tube digestif (figure 4) :

i) le plexus de Meissner également appelé plexus sous-muqueux innervant la muqueuse. Ce plexus est principalement présent dans la paroi de l'intestin et il est peu développé dans l'estomac (Anlauf, Schäfer, Eiden, & Weihe, 2003).

ii) le plexus d'Auerbach situé entre les deux couches de la musculeuse. Ce plexus est présent dans tout le tube digestif (Anlauf et al., 2003).

Le SNE permet de réguler la motricité digestive et la sécrétion d'eau et d'électrolytes. Par ailleurs, la muqueuse du tube digestif est en contact avec le milieu extérieur et constitue donc une voix d'entrée pour de nombreux pathogènes. Pour conserver l'homéostasie, il est donc

nécessaire de préserver l'intégrité de l'épithélium par le maintien des contacts intercellulaires et de mettre en place une réponse immunitaire rapide lors d'une agression extérieure. Pour cela les informations concernant le contenu luminal et l'état de la muqueuse doivent être rapportées rapidement au SNC.

Le SNE contient des fibres sympathiques et parasympathiques provenant du SNC et des neurones. Les neurones entériques ont été classés selon leur fonctions physiologiques présumées en se basant sur leur implication dans l'activité entérique, leurs formes, leurs projections ainsi que leur neurotransmetteurs. On trouve ainsi :

i) des neurones afférents primaires intrinsèques qui jouent un rôle dans le contrôle et la régulation des réponses du tube digestif aux stimuli chimiques ou mécaniques (Furness, Kunze, Bertrand, Clerc, & Bornstein, 1998).

ii) des interneurones qui interviennent dans les réflexes locaux de motricité (par la libération d'acétylcholine (ACh) et de sérotonine (5-HT)) et dans la propagation du complexe de migration myoélectrique (par la libération d'ACh et de somatostatine) (Furness, 2000; Pompolo & Furness, 1998).

iii) des neurones moteurs qui se divisent en cinq groupes : les neurones excitateurs du muscle, les neurones inhibiteurs du muscle, les neurones sécrétomoteurs-vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules endocrines de l'estomac (Furness, Clerc, Lomax, Bornstein, & Kunze, 2000). Les neurones excitateurs ou inhibiteurs innervent les muscles circulaires et longitudinaux tout comme la *muscularis mucosae.* Ces neurones libèrent de l'ACh et des tachykinines (pour les neurones excitateurs) et du monoxyde d'azote, et le vaso-intestinal peptide (VIP) (par les neurones inhibiteurs) (Furness, 2000). Les neurones sécrétomoteurs régulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes.

Chez l'homme, 100 millions de neurones composent le SNE avec une densité neuronale plus importante dans le plexus myentérique que dans le plexus sous-muqueux (J. D. Wood, Alpers, & Andrews, 1999).

En 1981, Dogiel a noté la présence de cellules satellites nuclées à proximité des neurones entériques. Il a été démontré grâce à des expériences d'immunohistochimie et de microscopie électronique que ces cellules présentaient une structure similaire aux astrocytes ainsi que l'expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) et de la S100-β (*S100 ca^{2+} binding protein β*), deux protéines caractéristiques des astrocytes du SNC (Cook & Burnstock, 1976; Ferri et al., 1982; Jessen & Mirsky, 1983). Ces cellules sont appelées cellules gliales entériques (CGE). Elles sont beaucoup plus nombreuses que les neurones. En effet, le rapport

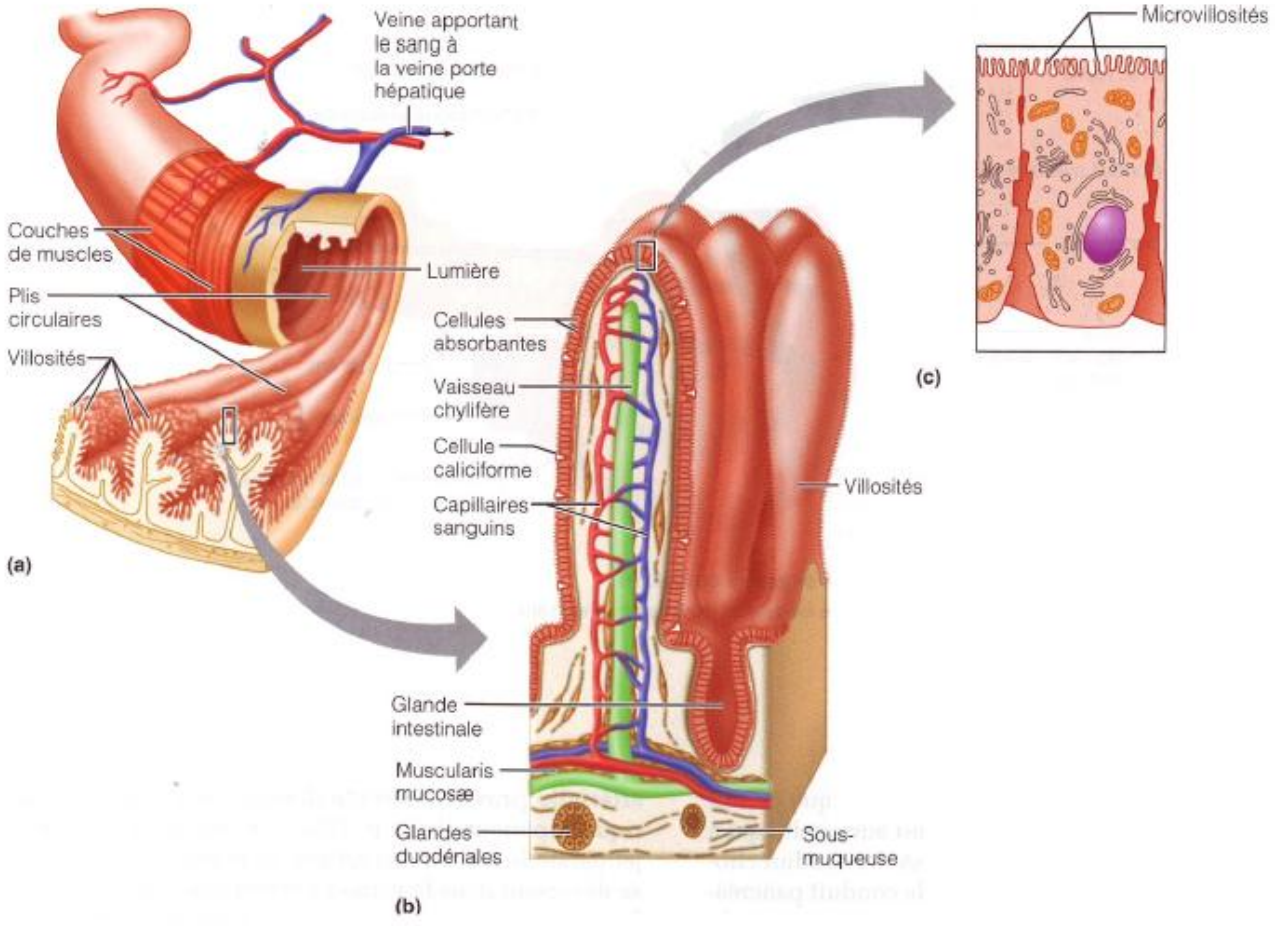


Figure 5. Surface optimisée de l'épithélium intestinal.

a) Coupe du tube digestif montrant des plis circulaires composés de villosités intestinales.
b) Structure d'une villosité intestinale.
c) Cellules épithéliale présentant des microvillosités au pôle apical.
D'après Marieb E.N, Anatomie et physiologie humaine, édition Pearson Education 2005.

nombre de CGE/ nombre de neurones est 1,3 à 1,9 dans le plexus sous-muqueux et de 5,9 à 7,0 dans le plexus myentérique (Hoff et al., 2008). Les CGE ne sont pas de simples cellules de support, elles interagissent avec les cellules environnantes. Les CGE permettent ainsi la régulation des fonctions de la barrière épithéliale comme les astrocytes induisent la régulation de la barrière hémato-encéphalique (M Neunlist, Van Landeghem, Bourreille, & Savidge, 2008) (cf V. rôle du système nerveux dans le contrôle de la barrière).

De part leur importance dans mon travail de thèse, seule la structure et la fonction de l'intestin (intestin grêle et côlon) seront développées.

3) Fonction et structure de l'intestin grêle

L'intestin grêle est le site principal d'absorption des nutriments. Il assure leur transfert de la lumière intestinale vers le milieu intérieur dans lequel ils seront disponibles pour l'organisme. Cette fonction est facilitée par une surface d'échange optimisée (figure 5).
Chez l'homme l'intestin grêle mesure 7 mètres de longueur et est organisée en anse intestinale. Sa paroi est composée de replis macroscopiques d'environ 1 cm appelés valvules conniventes ou valvules de Kerckring. Chaque valvule possède une multitude de petites évaginations de 0,5 à 1 mm de hauteur nommées les villosités intestinales. Entre les villosités, on observe des cryptes de Lieberkühn qui sont des invaginations de la muqueuse. Cette augmentation de surface d'échange permet de potentialiser l'absorption des nutriments par le tube digestif.
L'acquisition d'une surface d'échange maximale est également visible au niveau cellulaire. En effet, l'épithélium intestinal est composé d'une monocouche de cellules épithéliales, les entérocytes. Ils présentent à leur surface des expansions membranaires appelées microvillosités mesurant de 1 à 2 µm de hauteur. Grâce à ces différents niveaux d'organisation, on estime que l'intestin grêle présente une surface totale équivalente à celle d'un terrain de tennis, soit environ 250 m².

L'intestin grêle s'étend du sphincter pylorique (situé à la sortie de l'estomac) jusqu'à l'entrée du côlon marquée par la valve iléo-caecale. Il est divisé en trois fragments :
1) le duodénum : long d'environ 25 cm, il débute à la sortie du pylore. Sa forme de C semble moulée sur la tête du pancréas

2) le jéjunum : long d'environ 2,5 m, il parcourt le centre de la cavité abdominale en effectuant de nombreux replis appelés anses intestinales. Le jéjunum paraît plus rouge que le reste de l'intestin grêle du fait de sa riche vascularisation. Le jéjunum se continue avec l'iléon sans limite nette.
3) l'iléon : long d'environ 3,6 m, il présente également des anses intestinales et occupe plutôt la partie basse de la cavité abdominale, entre les parties ascendante et descendante du côlon.
L'iléon se termine au niveau du caecum, dans la fosse iliaque droite, où il débouche par la valvule de Bauhin, un système anti-retour qui interdit toute remontée de déchets du côlon vers l'intestin grêle.
Le duodénum est un segment fixe tandis que le jéjunum et l'iléon sont mobiles pour pouvoir assurer le péristaltisme.

4) Fonction et structure du côlon

Lorsque le chyme atteint le côlon, la quasi totalité des nutriments ainsi que 90% de l'eau ont déjà été absorbés. Le côlon termine la digestion par la déshydratation du chyme (eau restante et électrolytes), par la coopération de la flore bactérienne intestinale et l'évacuation les déchets résiduels vers le rectum. Dans le côlon droit, la flore bactérienne iodophile permet la fermentation de certaines fibres alimentaires produisant ainsi de l'acétate, du proprionate et du butyrate. Tandis que dans le côlon gauche, les bactéries permettent la digestion des débris cellulaires, des mucines et des protéines exsudées par le mécanisme de putréfaction. Le côlon présente un bel exemple de relation symbiotique entre l'organisme et la flore bactérienne.
Le côlon n'ayant pas une fonction majeure dans l'absorption, il ne présente pas de replis permettant d'optimiser la surface d'échange. Ainsi, le côlon ne possède pas de anses intestinales, ni de valvule connivente et de villosité.

Le côlon mesure environ 1,5 m et constitue la partie terminale de l'intestin. Il s'étend du caecum au rectum et se divise en quatre segments :
1) le côlon ascendant remonte vers le foie
2) le côlon transverse passe de droite à gauche devant l'estomac et remonte un peu sous les côtes gauches.
3) le côlon descendant descend vers le bassin
4) le côlon sigmoïde pénètre dans le bassin.

5) Epithélium du tube digestif

Le tube digestif est tapissé d'un épithélium qui constitue depuis l'œsophage jusqu'au rectum une barrière physique entre le milieu intérieur (l'organisme) et son environnement extérieur. Chaque partie du tube digestif possède un épithélium spécialisé dans son organisation morphologique et dans les types de cellules épithéliales qui le composent.

L'œsophage présente un épithélium pavimenteux stratifié ou malpighien non kératinisé assurant une fonction de protection envers la friction du bol alimentaire contre la paroi œsophagienne. Cet épithélium associé au chorion, forme une muqueuse qui présente de profonds replis au repos permettant une distension importante de la paroi lors du passage du bol alimentaire.

Au niveau de l'estomac, la muqueuse qui est composée d'un épithélium simple prismatique forme de nombreux replis longitudinaux permettant une grande distension après les repas. Cet épithélium est composé de cellules spécialisées dans la sécrétion de mucus protégeant la surface de la muqueuse de l'autodigestion due à l'acide chlorhydrique et à la pepsine libérés par les cellules des glandes gastriques sous-jacentes à l'épithélium.

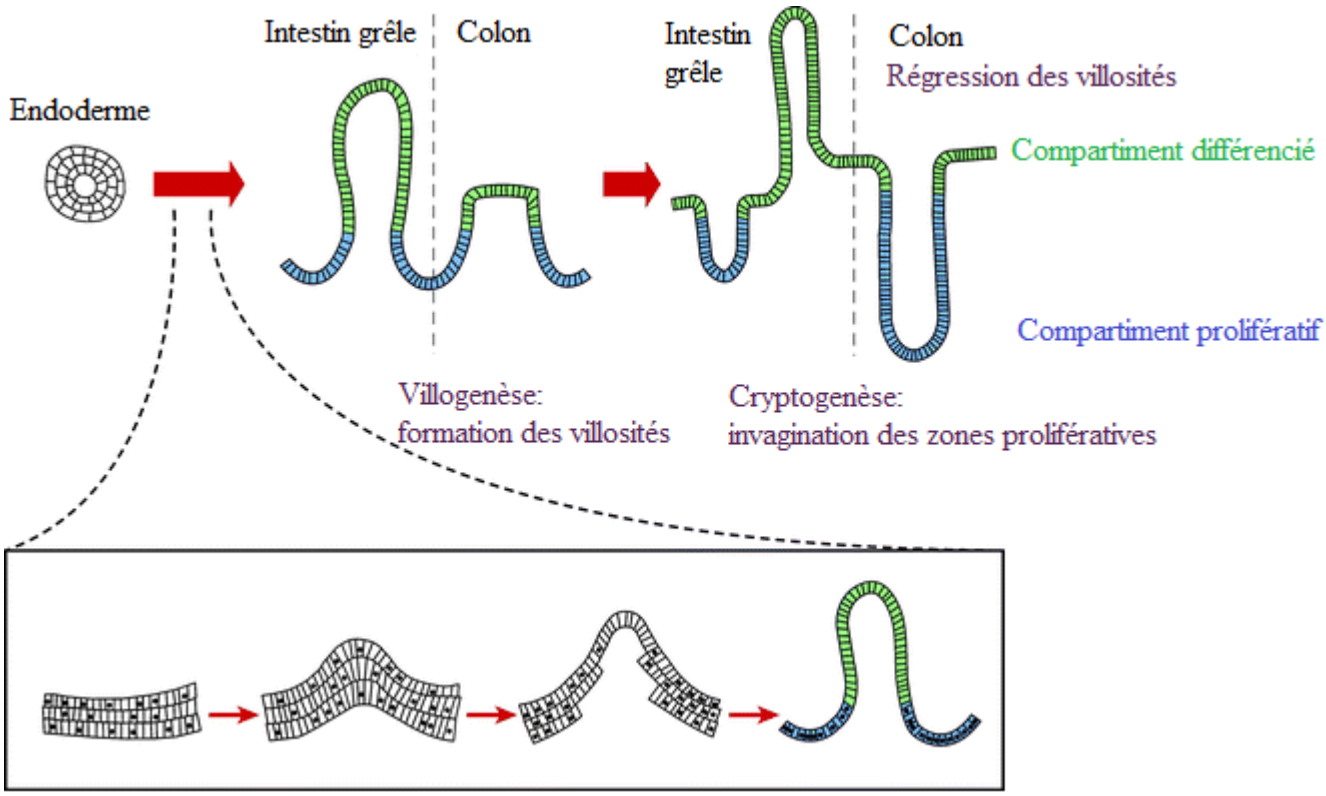


Figure 6. Morphogenèse de l'épithélium intestinal.

Le tube digestif se forme à partir de l'endoderme, qui subit un remodelage jusqu'à former un tube, lequel sera délimité par un épithélium pluristratifié.
Le remodelage de la muqueuse et la formation des villi débutent vers la 8ème semaine de développement embryonnaire (sE8). La villogenèse commence au niveau du duodénum. Il est ainsi observé des villosités à la sE9 dans le duodénum, entre sE12-13 dans les segments de l'intestin grêle et à sE16 dans le colon. La villogenèse est permise par le regroupement des cellules mésenchymateuses sous l'épithélium alors pluristratifié. Le mésenchyme envoie des projections à l'intérieur de cet épithélium, formant alors le tissu conjonctif. Puis l'épithélium devient progressivement monostratifié depuis l'apex des villi jusqu'à leur base et seules les zones intervillaires demeurent pluristratifiées.
La cryptogenèse se produit par invagination des zones prolifératives ; elle débute en sE16 sur l'axe proximo-distal. Entre sE20 et sE25, les villosités présentent au niveau du côlon régressent progressivement suivant l'axe disto-proximal.
D'après Sancho et al. 2004.

II. Structure et homéostasie de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules qui borde la lumière du tube digestif. La fonction principale de cet épithélium est l'absorption des nutriments au cours de la digestion. Cette muqueuse sert également de barrière vis-à-vis de nombreuses stimulations antigéniques d'origine alimentaire, bactérienne, virale et parasitaire.
Cet organe est la cible d'agressions permanentes dont l'accumulation peut conduire à une réponse inflammatoire chronique. Cette accumulation favorise une dérégulation de la morphologie et des fonctions de l'intestin responsables de diverses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou les cancers colorectaux (CCR). L'homéostasie et la fonctionnalité de cet épithélium dépendent de plusieurs populations cellulaires réparties dans les différentes couches constituant le tube digestif.

1) Architecture de l'axe crypto-villositaire

a) Ontogenèse de l'épithélium intestinal

L'acquisition de la forme définitive de l'épithélium intestinal fait intervenir différents processus conservés chez les mammifères.
C'est au cours de la quatrième semaine de développement embryonnaire que débute la formation des principaux organes à partir de chacun des trois feuillets (ectoderme, endoderme, mésoderme) et du mésenchyme intra-embryonnaire. La muqueuse intestinale des vertébrés a pour origine l'endoderme, responsable de la formation de l'épithélium et le mésoderme qui donne naissance au tissu conjonctif sous-jacent et au muscle lisse qui compose la sous-muqueuse. Après 22 semaines de gestation, les cellules absorbantes de l'embryon sont semblables aux cellules d'un adulte.
Le remodelage de la muqueuse et la formation des villi débutent vers la 8ème semaine de développement embryonnaire (sE8) (figure 6).
La villogenèse commence au niveau du duodénum. Il est ainsi observé des villosités à la sE9 dans le duodénum, entre sE12-13 dans les segments de l'intestin grêle et à sE16 dans le côlon. La villogenèse est permise par le regroupement des cellules mésenchymateuses sous l'épithélium alors pluristratifié. Le mésenchyme envoie des projections à l'intérieur de cet épithélium, formant alors le tissu conjonctif. Puis l'épithélium devient progressivement

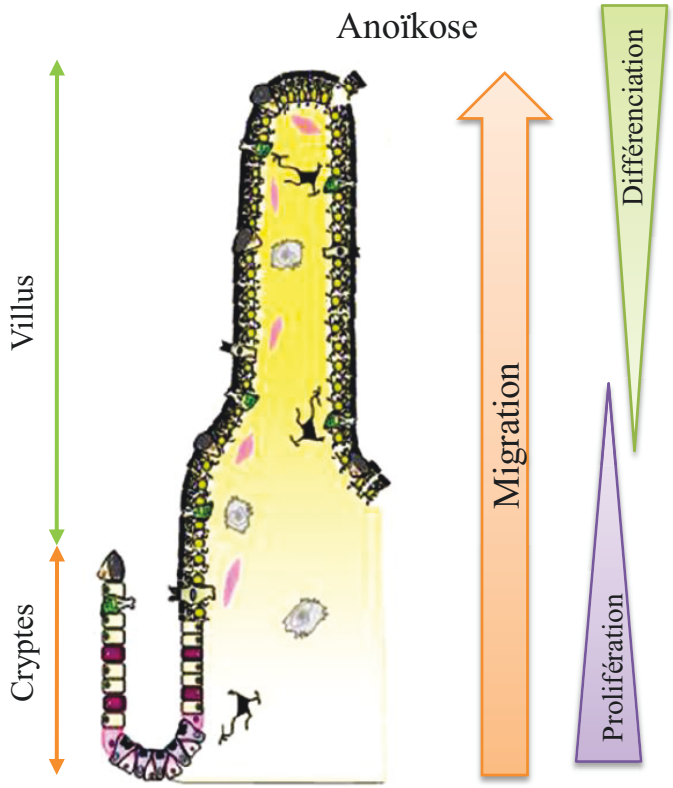


Figure 7. Organisation de l'axe crypto-villositaire.

L'épithélium de l'intestin grêle est constitué de deux structures différentes d'un point de vue anatomique et fonctionnel: les cryptes et les villus.

monostratifié depuis l'apex des villi jusqu'à leur base et seules les zones intervillaires demeurent pluristratifiées.
La cryptogenèse se produit par invagination des zones prolifératives ; elle débute en sE16 sur l'axe proximo-distal. Entre sE20 et sE25, les villosités présentent au niveau du côlon régressent progressivement suivant l'axe disto-proximal.

b) Le renouvellement de l'épithélium

L'épithélium intestinal se renouvelle continuellement. Le taux de renouvellement est d'environ 10^{11} cellules par jour chez l'homme. Ce renouvellement demande entre 3 à 5 jours, c'est le temps nécessaire aux cellules pour migrer de la base de la crypte vers l'apex des villi.
Afin de préserver l'intégrité du tissu intestinal, il est impératif que la quantité de cellules naissantes soit équivalente à celle qui disparaissent. Au niveau de l'intestin grêle, les processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire sont physiquement compartimentés, respectivement dans les cryptes et les villi.
Les tissus à renouvellement rapide comme l'intestin possèdent un stock de cellules multipotentes indifférenciées aptes à donner les différents types cellulaires composant le tissu. Les cellules souches réalisent des divisions asymétriques donnant naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule progénitrice déjà ancrée dans un lignage cellulaire. Les cellules progénitrices réalisent alors 3 à 4 divisons afin de se différencier en cellules absorbantes, entéroendocrines ou sécrétrices. A l'exception des cellules de Paneth, cette différenciation s'accomplit lors de la migration des cellules en cohorte (migration collective) de la base de la crypte vers le haut des villi (différenciation selon l'axe crypto-villositaire) (figure 7). A l'apex des villi, les cellules perdent leur capacité à adhérer à la lame basale, elles se détachent et meurent par anoïkis puis sont exfoliées dans l'intestin grêle (Frisch & Francis, 1994).
L'altération de l'équilibre entre le renouvellement et la mort cellulaire participe à la physiopathologie des maladies inflammatoires digestives et du développement tumoral.

c) Réparation de l'épithélium intestinale

La barrière épithéliale est soumise à de nombreuses agressions telles que l'irritation mécanique de la muqueuse lors du passage du chyme dans le tube digestif ou la déformation répétée de la muqueuse lors du péristaltisme. Ces agressions physiques conduisent à des altérations de la barrière épithéliale qui devient alors perméable.

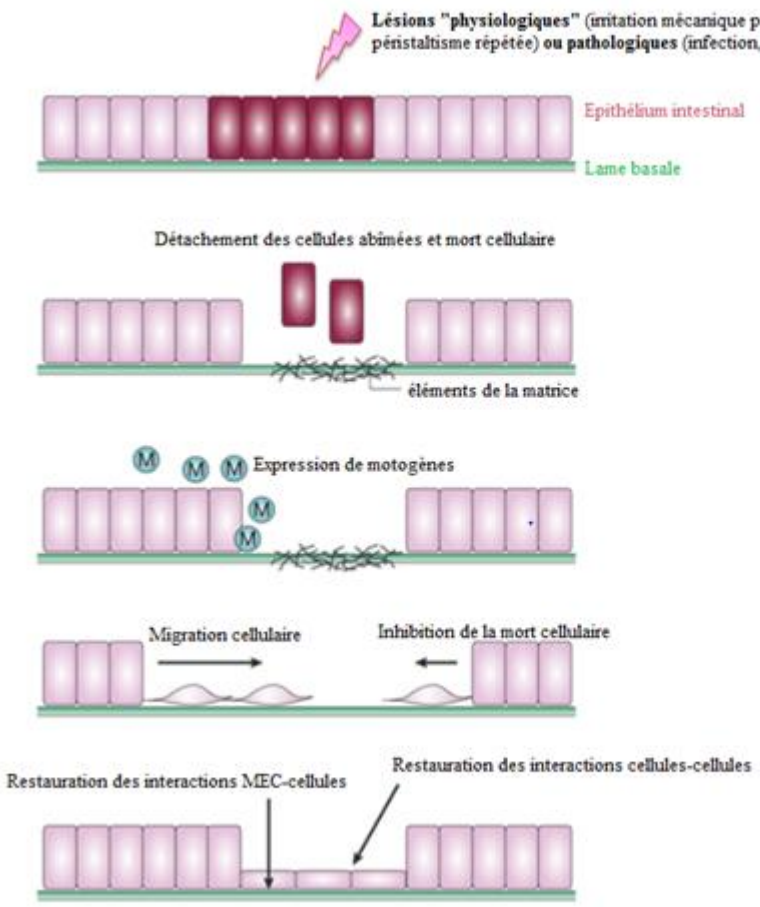


Figure 8. Mécanisme de réparation de l'épithélium intestinal.

1-2) Lors d'une lésion locale, les cellules abimées se détachent de la lame basale qui est modifiée et meurent.
3) Afin de réparer l'intégrité de la barrière épithéliale, les cellules épithéliales adjacentes et les cellules sous-muqueuse libèrent des motogènes (M).
4) Cela est suivi de la migration de cellules épithéliales intactes associée à l'inhibition de la mort cellulaire.
5) La restauration des fonctions de la barrière épithéliale est permis par formation des contacts intercellulaires et des contacts cellules-matrice.
D'après Topin et Podolsky, 2003.

Ces défauts de continuité de l'épithélium intestinal sont également observés lors d'infection ou lors d'épisode inflammatoire associé aux MICI.

Afin de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale des systèmes de réparation sont mis en place. Deux processus permettent d'aboutir à la régénération de la continuité et des fonctions de l'épithélium intestinal (figure 8) :

i) la restitution : ce mécanisme est caractérisé par l'étalement des cellules viables environnantes à la lésion (Lacy, 1988). Ce processus est indépendant de celui de la prolifération cellulaire (Mammen & Matthews, 2003). Ce phénomène est rapide pour éviter la perte d'électrolytes et de fluides et empêcher les bactéries et les antigènes de la lumière intestinale de pénétrer dans le compartiment gastro-intestinal ce qui stimulerait le système immunitaire. Le processus de restitution intestinal peut être modulé par plusieurs facteurs motogènes tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et TGFα (*Transforming Growth Factor*) ainsi que des cytokines, des polyamines et des TFF (*trefoil factor)* (Sturm & Dignass, 2008; Taupin & Podolsky, 2003).

ii) la régénération : ce mécanisme implique la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, ainsi que le rétablissement des contacts intercellulaires et des interactions cellules-MEC (Taupin & Podolsky, 2003).

La réparation de lésions superficielles demande quelques heures à quelques jours. Tandis que des lésions plus sévères exigent plusieurs jours à plusieurs semaines et peut également impliquer le remodelage de la MEC voire des couches inférieures (Podolsky, 1999).

2) Les cellules spécialisées

L'épithélium digestif est composé de quatre types cellulaires différenciés qui exercent des fonctions différentes et sont regroupés en deux familles : les cellules absorbantes (représentant 80% des cellules totales) et les cellules sécrétrices (figures 9-10). Les cellules intestinales sont issues de la différenciation de cellules souches. Les caractéristiques de chacune sont présentées dans les figures 11 et 12.

a) Cellules souches

Le maintien de l'homéostasie intestinale est assuré par un renouvellement constant et rapide des cellules épithéliales. Pour compenser cette grande perte de cellules spécialisées, de

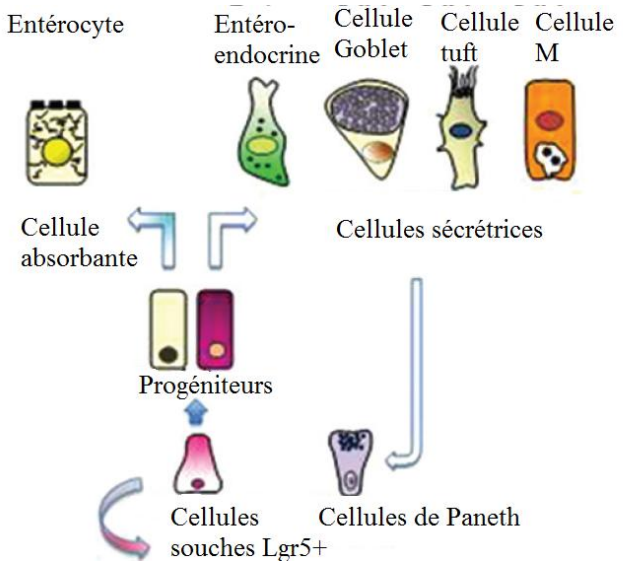


Figure 9. Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal.

L'épithélium intestinal est en renouvellement constant. Il contient des cellules souches situées dans la partie basse des cryptes. Elles donnent naissance à des cellules progénitrices qui prolifèrent puis se différencient vers des lignages sécréteurs (cellules entéroendocrines, cellules à mucus ou Goblet, Cellule tuft, cellule M) ou absorbant (entérocytes) au fur et à mesure de leur migration vers les villus avant de se détacher et de mourir par anoïkose. Les cellules de Paneth se différencient en migrant vers la base de la crypte.

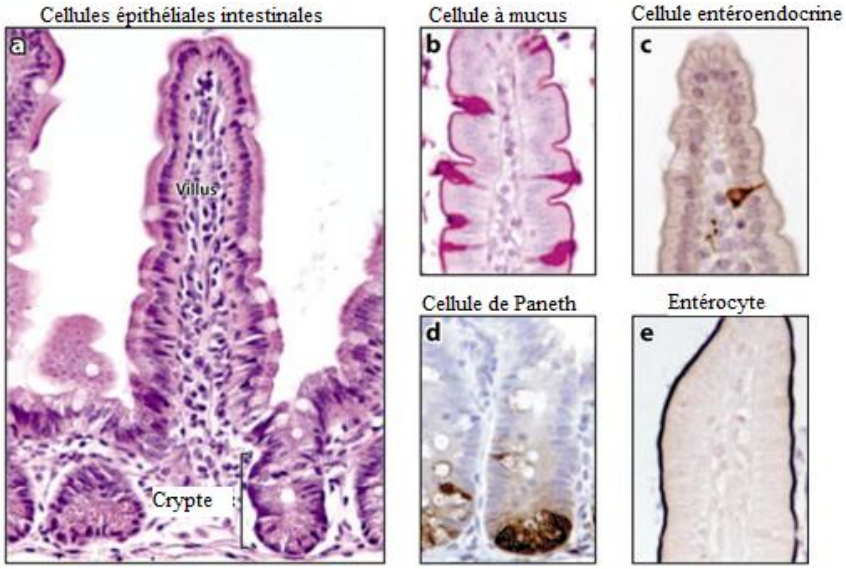


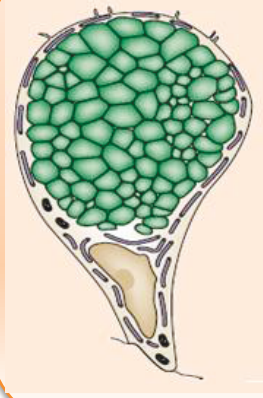
Figure 10. Cellules spécialisées de l'épithélium intestinal.

a) Morphologie de l'intestin de souris après un marquage à l'hématoxylin-éosine. L'intestin est composé d'une monocouche de cellules épithéliales formant des invaginations nommées cryptes de Lieberkühn et des protusions nommées villosités.
b) Cellules à mucus marquées par l'acide périodique et le réactif de Schiff
c) Cellules entéroendocrines détectées par un anticoprs anti-synaptophysine
d) Cellules de Paneth marquées par le lysosyme
e) Entérocytes marqués par la phosphatase alcaline

D'après Van der Flier, Clever 2009, Annu.Rev.Physiol.



Nom: Entérocyte
Représentation : 80-90%
Localisation: haut des cryptes
Type cellulaire: Absorbant
Fonction: Absorption des nutriments et export au pôle basal. Barrière, contrôle de la perméabilité
Caractéristiques: cellule polarisée avec bordure en brosse
Marqueurs: Cdx2, SI, DPPIV, PA, villine

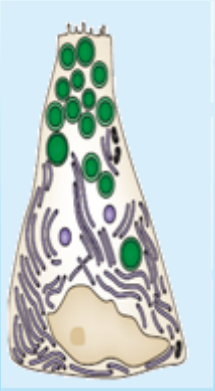


Nom: Cellule à mucus, caliciforme
Représentation : Gradient proximo-distal: intestin grêle: 5-15%, colon: 15-50%
Localisation: haut des cryptes
Type cellulaire: sécréteur
Fonction: Sécrétion de mucus = revêtement protecteur de l'épithélium, sécrétion de TFF = favorisant le transit du bol alimentaire
Signalisation: Notch, Hex5, Kfl4…
Marqueurs: Cdx2, muc2…



Nom: Cellule de Paneth
Représentation : 4%
Localisation: cryptes
Type cellulaire: sécréteur
Fonction: Réponse anti-microbienne, niche pour les cellules souches (produit des ligands pour les voies Wnt, Notch, EGF)
Caractéristiques: Différenciation en migrant vers le bas des cryptes (guidé par un gradient EphB2)
Marqueurs: Lyz1, Wnt3…

Figure 11. Les différentes cellules intestinales.



Nom: Cellule entéro-endocrine
Représentation : 0,4-1%
Localisation: Crypte/villus
Type cellulaire: Sécréteur
Fonction: Modulation endocrine: production et sécrétion d'hormone, essentiel à l'homéostasie intestinal
Caractéristiques: nécissité de neurogenin 3 (Ngn3) pour se différencier
Marqueurs: Pdx-1, Nkx2, Pax4-6

Nom: Cellule souche
Représentation : <1%
Localisation: Crypte
Type cellulaire: Non différencié
Fonction: Renouvellement du tissu épithélial
Marqueurs: Asc12, Sox9, bmi, Lgr5…

Nom: Cellule Tuff
Représentation : Environ 0,4%
Localisation: Haute cryptes/villus
Type cellulaire: Sécréteur
Fonction: Senseur du contenu luminal, sécréteur d'opoïdes, modulation endocrine
Marqueurs: Sox9, ngn3, Dclk1…

Nom: Cellule M
Localisation: Dans les follicules/ au niveau des plaques de Peyer
Fonction: Cellules présentatrices de microbes aux lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques

Figure 12. Les différentes cellules intestinales.

nouvelles cellules sont générées à partir d'une population de cellules souches multipotentes qui résident à la base des cryptes, selon l'*Unitarian hypothesis* de Leblond (H. Cheng & Leblond, 1974). Il a d'abord été proposé suite à des expériences de marquage de l'ADN que les cellules en position (+4), directement après les cellules de Paneth, représentaient la population de cellules souches des cryptes (Che, Li, Chui, Roy, & Low, 2008; Potten, Hume, Reid, & Cairns, 1978; Potten, Kovacs, & Hamilton, 1974).
Des expériences de traçage de lignage avec des souris Cre-activable Rosa26-LacZ ont montré que les cellules en position (+4) expriment le marqueur Bmi1 et qu'elles sont capables de générer des clones représentatifs de tous les types cellulaires présents dans l'épithélium (Sangiorgi & Capecchi, 2008) (figure 13).

D'autres travaux ont proposé l'existence d'une zone à cellules souches aux positions +1 à +4 correspondant à une population de cellules progénitrices immatures situées à la base des cryptes et intercalées entre les cellules de Paneth (figure 13) (Bjerknes & Cheng, 1981; H. Cheng & Leblond, 1974). Ce sont les cellules colonnaires de la base des cryptes (cellules CBC, pour *Columnar Crypt Based Cells*). Ces cellules multipotentes (et pour certaines de grande longévité) produisent chaque jour des progéniteurs à l'origine de tous les types de cellules différenciées (Barker et al., 2007; Bjerknes & Cheng, 1999). En effet, chaque jour, une cellule CBC possédant le récepteur transmembranaire Lgr5+ (qui reconnaît le facteur de croissance R-spondin nécessaire au maintien de ces cellules *in vitro*) (Carmon et al., 2011 ; de Lau et al., 2011) est capable de produire 16 à 32 cellules épithéliales différenciées. Chaque crypte contient jusqu'à 15 cellules souches Lgr5+.
Il est admis que les cellules CBC représentent les cellules souches « statutaires » des cryptes alors que les cellules en position +4 constituent une population de cellules souches de réserve qui interviendrait pour restaurer les cellules Lgr5+ endommagées ou pour compenser leur perte (Tian et al., 2011). Il existerait donc un équilibre entre les cellules souches Lgr5+ et celles à +4 (Bmi1+) (Takeda et al., 2011).

Le micro-environnement des cellules souches, définit comme la « niche », contrôle l'activité et la survie de la population de cellules souches. Il assure entre autre ce rôle par l'intermédiaire de signaux moléculaires impliquant l'expression de récepteurs membranaires et la libération de facteurs trophiques par les cellules environnantes ainsi que par le support matriciel. On a longtemps pensé que le mésenchyme épithélial qui entoure les cryptes

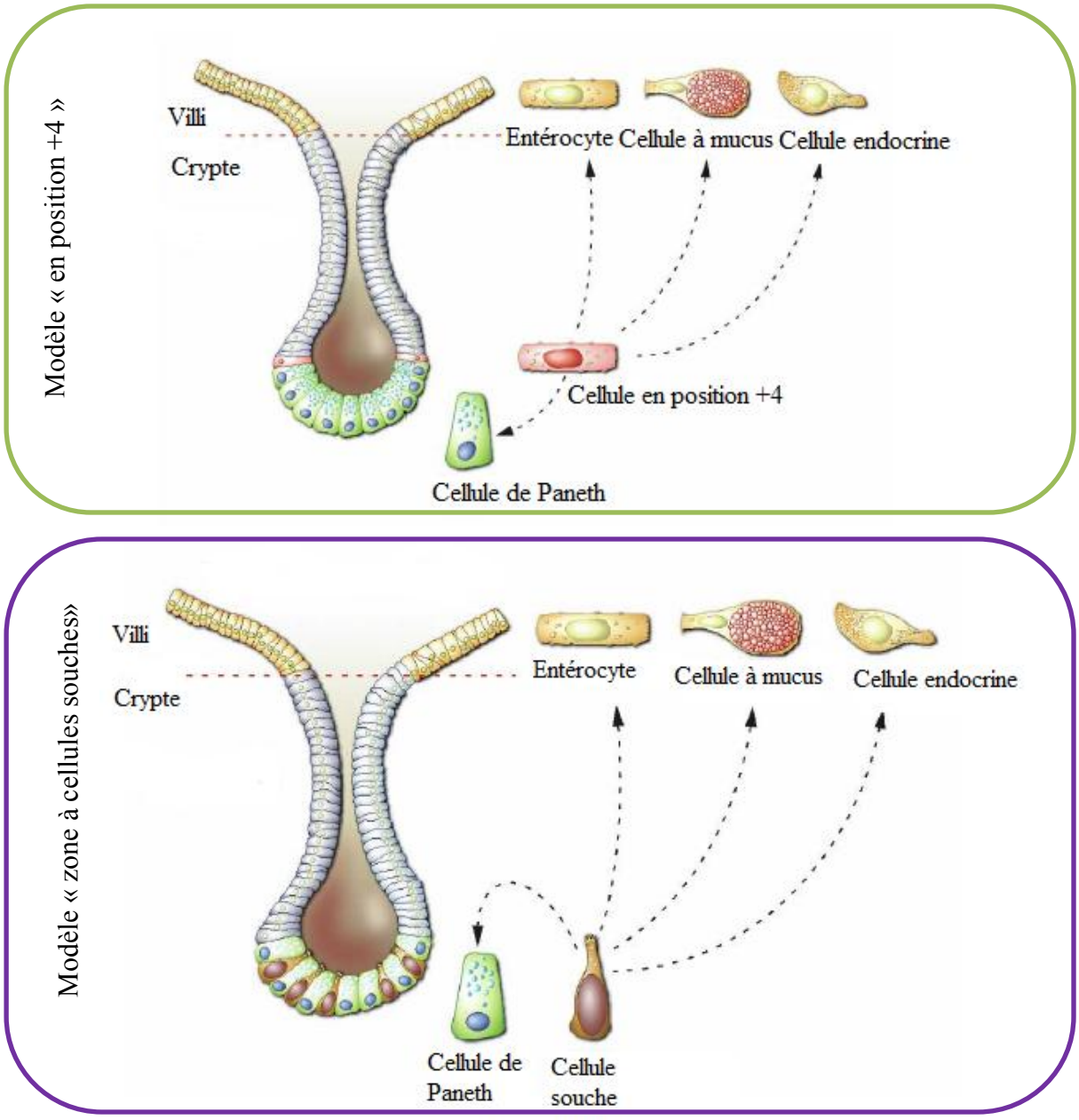


Figure 13. Localisation des cellules souches.

L'identification et la localisation des cellules souches sont controversées depuis 30 ans. Deux paradigmes s'opposent :

a) Celui du haut, dans le modèle « en position +4 » les cellules de la crypte sont exclusivement des cellules différenciées de Paneth, les cellules souches ne se situant qu'ne position +4. Ce modèle prédit que la différenciation des entérocytes, des cellules à mucus et des cellules endocrines dérivent des progéniteurs en +4 et migrent vers l'apex des villi.

b) Celui du bas, dans le modèle « zone à cellules souches », Leblond et ses collègues proposent l'existence d'une zone à cellules souches aux positions +1 à +4 correspondant à une population de cellules progénitrices immatures situées à la base des cryptes et intercalées entre les cellules de Paneth. Ce sont les cellules colonaires de la base des cryptes (CBC).
D'après Barker 2008, Gen Dev.

constituait cette niche. Récemment, les cellules de Paneth sont apparues comme de sérieuses candidates pour constituer cette niche (T. Sato et al., 2011).
Le nombre de ces cellules est constant et identique à celui des cellules souches. En plus de leur rôle bactéricide, ces cellules sécrètent des facteurs trophiques tels que l'EGF, le TGF-α, Wnt3 nécessaires à la survie des cellules souches *in vitro*. Elles expriment aussi Dll4 (*Delta-like 4*), un ligand du récepteur Notch présent sur les cellules souches et qu'elles activent du fait de leurs positionnements respectifs à la base des cryptes.
D'autre part, la déplétion des cellules de Paneth *in vivo* entraîne la perte des cellules souches Lgr5+. Ces résultats indiquent que les cellules de Paneth constituent un élément indispensable de la niche des cellules souches intestinales.

b) Cellules absorbantes

Représentant 80% des cellules totales de l'épithélium intestinal, l'entérocyte tient un rôle majeur dans la fonction de l'épithélium intestinal. Sa fonction première est l'absorption des nutriments : lipides, glucides, peptides, vitamines et sels minéraux présents dans la lumière du tube digestif.
Par ailleurs, la présence de complexes d'adhérence stables au niveau de leurs membranes latérales permet d'assurer l'imperméabilité de l'épithélium en créant une barrière imperméable entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, favorisant ainsi le transport sélectif des nutriments et empêchant le passage de microorganismes indésirables.
Au niveau du côlon, les cellules assurant les mêmes fonctions que les entérocytes sont appelées colonocytes.
Les entérocytes sont des cellules polarisées : leur pôle basal est ancré à la matrice extracellulaire *via* des complexes protéiques et leur pôle apical, qui est dédié à l'absorption des nutriments, présente une bordure en brosse constituée de microvillosités destinées à augmenter la surface d'échange avec le milieu extérieur.
Cette membrane est riche en radeaux lipidiques regroupant un grand nombre de protéines spécifiques servant au transport actif de certains nutriments, comme les transporteurs de sucres de la famille GLUT. De plus, le pôle apical est riche en enzymes permettant de finaliser la digestion telles que la sucrase isomaltase (SI) ou la phosphatase alcaline. L'activité de ces enzymes sert de marqueur de différenciation entérocytaire.

Le cytosquelette joue un rôle déterminant dans la structure et la fonction des entérocytes. En effet, les complexes d'interaction avec la matrice cellulaire ou avec les cellules voisines sont

associés au cytosquelette d'actine et de filaments intermédiaires. *In vitro*, l'actine forme des fibres de stress au niveau des complexes d'adhérence cellule-matrice et forme un réseau sous-cortical au niveau des contacts intercellulaires. Ces complexes jouent un rôle dans l'activation de diverses voies de signalisation et permettent de réguler par exemple les processus de prolifération ou ceux de différenciation entérocytaire en fonction de l'environnement cellulaire.

Les microvillosités sont également dépendantes du cytosquelette d'actine qui, en se polymérisant de façon rectiligne sous la membrane plasmique, la pousse de façon à former ces excroissances. Au niveau de cette bordure en brosse les filaments d'actine sont réticulés par une protéine spécifique, la villine qui peut elle aussi servir de marqueur de différenciation.

Par ailleurs, le cytosquelette de microtubules permet le transport vésiculaire antérograde (vers la membrane plasmique) des protéines synthétisées par l'entérocyte mais également le transport rétrograde (vers le pôle basal) de vésicules contenant les nutriments pour les envoyer vers la circulation sanguine ou lymphatique.

c) Cellules sécrétrices de mucus ou caliciformes

Ces cellules présentent une morphologie particulière en forme de vasque évasée au pôle apical, à l'origine de leur nom : les cellules caliciformes. Elles sont assez peu représentées au niveau de l'intestin grêle (5%) mais leur nombre augmente dans le côlon (15%). Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion du mucus, enrichi en protéines hautement glycosylées appelées mucines. Le mucus a pour fonction de protéger la muqueuse intestinale en formant une couche continue à la surface des cellules épithéliales. Il facilite ainsi le transit et forme une première barrière face aux microorganismes présents dans la lumière intestinale.

d) Cellules entéro-endocrines

Ces cellules sont de type sécrétoire : elles ne représentent que 0.4 à 1% des cellules épithéliales intestinales et sont plus nombreuses dans l'intestin grêle que dans le côlon.

Elles produisent des hormones et des neuropeptides comme la somatostatine, la sérotonine et le glucagon, permettant de réguler le métabolisme des cellules intestinales.

e) Cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont les seules cellules à se différencier en migrant vers le bas des cryptes (Garabedian, Roberts, McNevin, & Gordon, 1997). De type séreux zymogénique, elles sont caractérisées par la présence de nombreuses granules de sécrétion dans leur cytoplasme au pôle apical. Le contenu de ces vésicules peut varier d'une cellule à l'autre. Cependant, on note la présence d'α-défensine, de lysozymes et de chromogranine A. Ces cellules qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée ont une fonction antibactérienne notable au niveau de l'intestin (Elphick & Mahida, 2005). Elles possèdent une durée de vie d'environ trente jours et sont éliminées par les macrophages de la *lamina propria* (Troughton & Trier, 1969).

f) Cellules M

Au niveau de l'intestin grêle, il existe des structures nommées plaques de Peyer spécialisées dans la réponse immunitaire et composées de cellules M et de lymphocytes T organisés sous forme de follicule lymphoïdes. Les cellules M sont de type épithélial mais leur origine n'est pas clairement élucidée. Certaines hypothèse proposent que ces cellules sont issues
i) des cellules souches intestinales ;
ii) de progéntirices encore immatures ;
iii) d'entérocytes dédifférenciés.
Les cellules M diffèrent des entérocytes adjacents par l'absence de bordure en brosse et par la présence d'invaginations de la membrane plasmique basale qui contiennent des lymphocytes. Leur rôle est d'assurer le transport d'antigènes et de microorganismes de la lumière intestinale vers les follicules lymphoïdes sous-jacents, réalisant ainsi un échantillonnage du contenu antigénique de l'intestin pour le système immunitaire (Hamzaoui, Brahim, Zhioua, Ayed, & Hamzaoui, 2000). Les cellules M et les lymphocytes forment un épithélium particulier appelé « Follicule-associated-epithelium » (FAE) qui recouvre plusieurs follicules lymphoïdes formant ainsi les plaques de Payer.

g) Cellules Tuft

Ces cellules représentent environ 0,4% des cellules de l'intestin grêle ou du côlon. Leur fonction est encore mal connue. On sait cependant qu'elles expriment des enzymes

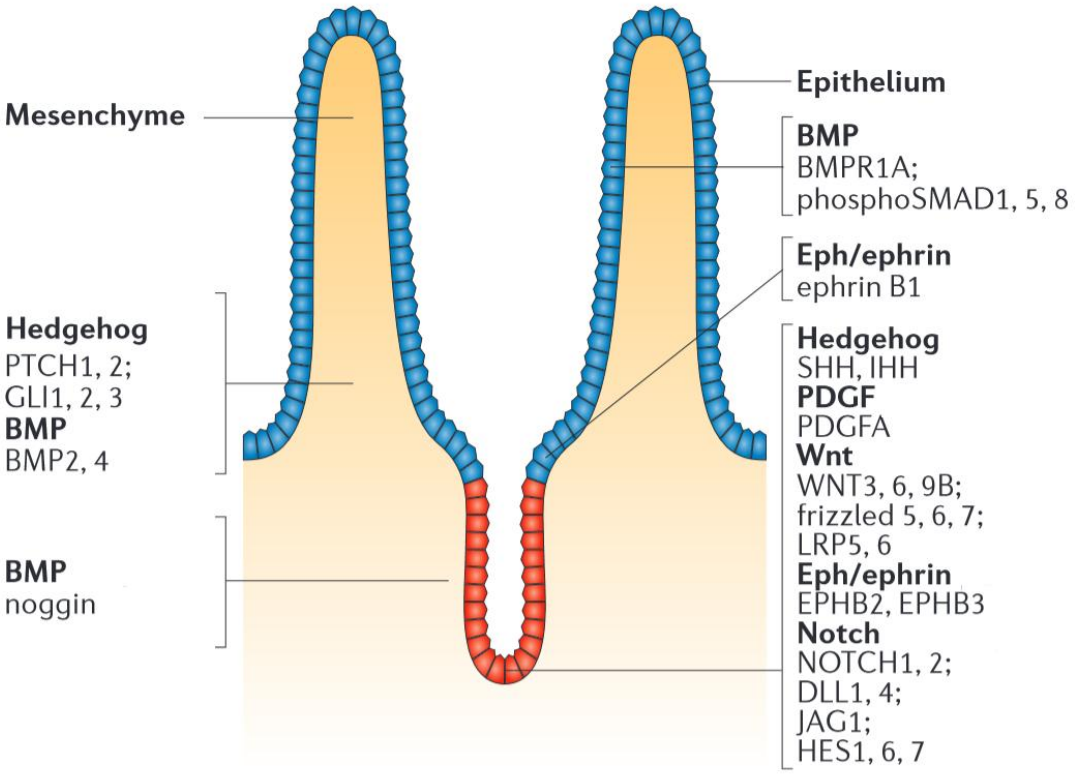


Figure 14. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le lignage cellulaire.

Le maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale nécessite l'expression différentielle de voies de signalisation impliquées dans les interactions entre le mésenchyme et les cellules épithéliales. La production de Hedgehog par les cellules épithéliales active la production de bone morphogenic Protein (BMP) dans le mésenchyme qui joue un rôle dans la différenciation entérocytaire. La voie Wingless type (Wnt) est active dans le fond des cryptes alors que les BMP sont actifs à la sortie des cryptes jusqu'à l'extrémité du villus. Ils assurent respectivement le maintien de la prolifération et la différenciation. Wnt augmente l'expression des Eph B et réprime celles des Ephrines induisant des gradients opposés d'expression de ce système ligand-récepteur impliqué dans la migration des entérocytes vers les villosités.
D'après Crosnier 2006, Nat Rev Genet .

impliquées dans la biosynthèse des prostanoïdes et des β-endorphines suggérant leur rôle dans l'inflammation, la motricité et la douleur digestive.

3) Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et le lignage cellulaire

La régulation fine de la prolifération et de la différenciation épithéliale est déterminée par nombreuses voies de signalisation telles que Hedgehog (Hh), Bone Morphogenic protein (BMP), Wingless type (Wnt), Notch.
Ces voies contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales (figure 14).

La voie Wnt : cette voie est essentielle dans le développement et le renouvellement de l'épithélium intestinal. Elle participe au maintien de la prolifération et des cellules dans un état indifférencié au niveau des cryptes (Pinto & Clevers, 2005). L'association de Wnt 3, 6, 9B et des récepteurs épithéliaux Frizzled 5, 6 et 7 amène à l'inhibition de la dégradation de la β-caténine (Senda, Iizuka-Kogo, Onouchi, & Shimomura, 2007). Cette caténine est alors accumulée dans le cytoplasme pour être ensuite transloquée dans le noyau où en association avec le facteur de transcription TCF4, elle active des gènes pro-prolifératifs du cycle cellulaire comme la Cycline D1 et p21 (van de Wetering et al., 2002) et où elle réprime le gène codant pour l'Ephrine-B1. L'expression transgénique de Dickkopf1 (Dkk1) qui est un inhibiteur de la voie Wnt, entraîne la perte du compartiment prolifératif et la réduction de la taille et du nombre de villosités (Pinto, Gregorieff, Begthel, & Clevers, 2003). De même on observe une perte des cellules souches et donc du renouvellement de l'épithélium après invalidation de la β-caténine dans l'épithélium intestinal (Fevr, Robine, Louvard, & Huelsken, 2007). Cette voie est donc nécessaire dans le maintien des cellules souches indifférenciées. L'expression différentielle du ligand de Wnt le long de l'axe crypto-villositaire permet de contrôler la répression du gène codant pour l'Ephrine-B1. Cette protéine active le Récepteur EphB3/4 responsable de la compartimentation des zones prolifératives et différenciées. Le cas des cellules de Paneth est unique puisque ce sont les seules cellules à se différencier en migrant vers le bas des cryptes. Il a été mis en évidence que leurs progéniteurs intègrent différemment le signal Wnt, qui active EphB3. Chez les souris $Eph^{-/-}$, les cellules de Paneth migrent dans toutes les directions (Batlle et al., 2002).

La voie Notch/Delta : cette voie de signalisation participe au maintien du pool de cellules souches et à la détermination du lignage cellulaire (absorbant et sécréteur) grâce à des signaux d'inhibition latérale (Zecchini, Domaschenz, Winton, & Jones, 2005). En effet, Notch est un récepteur membranaire activé par les ligands Delta ou Jagged (également transmembranaires) induisant le clivage de Notch par la métalloprotéase ADAM10 et la γ-sécrétase (Sander & Powell, 2004). Le fragment intracellulaire du récepteur NCID (*notch intra-cellular domain*) est libéré dans le cytoplasme et est transloqué dans le noyau où il régule la transcription de gène cibles. NCID réprime le facteur de transcription Math1 important dans la détermination du lignage sécréteur. L'altération de cette voie par l'utilisation d'inhibiteur de la γ-sécrétase ou par suppression génique ($math^{-/-}$) induit la régression des cryptes par une diminution de la prolifération et une augmentation des cellules sécrétrices (van Es et al., 2005).
La voie Notch/Delta fonctionne comme un interrupteur déterminant le lignage absorbant ou le sécréteur. Dans l'intestin, les cellules souches expriment fortement Notch ce qui entraîne une répression de Math-1. Ainsi en l'absence de Math-1, les cellules demeurent des cellules souches ou se différencient en entérocytes. Tandis que les cellules exprimant Math-1 seront de type sécrétoire.
Les voies Wnt et Notch/Delta coopèrent pour maintenir le stock de cellule souches prolifératives dans les cryptes. L'inhibition de l'une d'entre elle entraîne un arrêt de la prolifération (Crosnier, Stamataki, & Lewis, 2006).

La signalisation Hedgehog : cette voie de signalisation est impliquée dans l'arrêt de la prolifération dans les cryptes. Elle implique les ligands *Sonic hedgehog* (Shh) et *Indian hedgehog* (Ihh) produits et secrétés par l'épithélium inter-villositaire (Madison et al., 2005). Shh et Ihh interagissent avec les récepteurs Patched 1/2 exprimés par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes à l'épithélium.
Après activation de ces récepteurs, les cellules mésenchymateuses produisent des BMP 2/4 stimulant les récepteurs BMPR1A exprimés sur les cellules épithéliales induisant l'activation des facteurs de transcription Smad1, 5 et 8 (Howe et al., 2001). Au niveau des cryptes, l'expression des BMP est concomitante à la libération de noggin, un antagoniste de BMP. Ainsi la signalisation induite par BMP est confinée à la partie villositaire de l'épithélium.
Ces signaux participent à la régulation des inhibiteurs du cycle cellulaire et permet aux cellules épithéliales de se différencier. Lorsque ces voies de signalisation sont altérées, elles conduisent à un phénomène d'hyper-prolifération et une perte de la différenciation épithéliale et une régression des villosités (Madison et al., 2005; van Dop et al., 2009).

Ces voies de signalisation permettent de maintenir l'organisation et le bon fonctionnement de l'épithélium épithélial. Leur altération induit la perte de la différenciation cellulaire, une augmentation de la prolifération et conduit ainsi au développement tumoral.

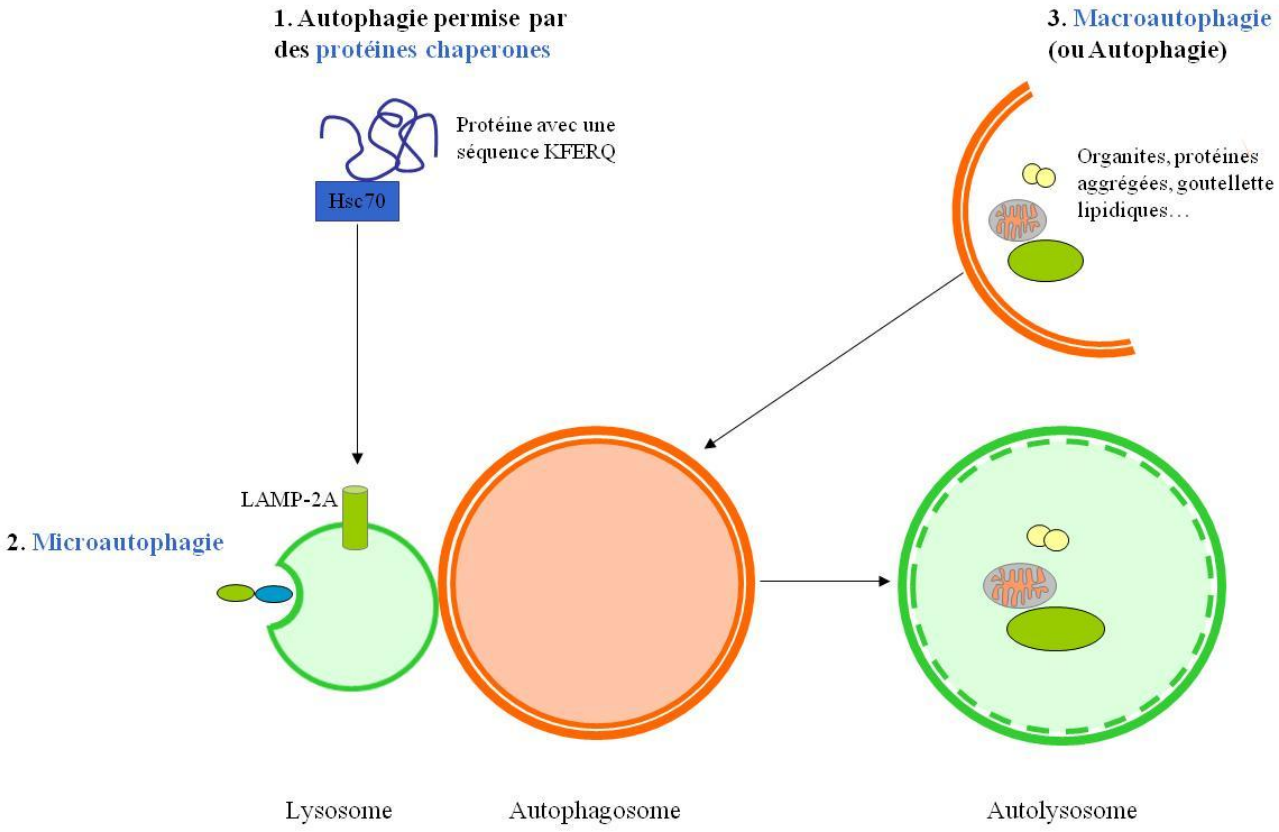


Figure 15. Les différents types d'autophagie.

1. L'autophagie permise par les protéines chaperonnes implique la protéine Hsc70 ciblant les protéines à dégrader et ayant une séquence consensus KFERQ. La protéine membranaire LAMP-2A portée par le lysosome permet le transport de la protéine marquée par Hsc70 dans le lysosome en vue de sa dégradation.
2. La microautophagie implique l'invagination de la membrane du lysosome qui piège qui piège le contenu cytoplasmique pouvant être des protéines ou des lipides.
3. La macroautophagie également appelée autophagie est le mécanisme le plus répendu et le mieux étudié qui conduit à la formation d'une structure à double membranes (autophagosome) qui fusionne avec le lysosome (autolysosome) en vue de détruire le matériel cellulaire séquestré dans l'autophagosome .

III. L'autophagie : processus impliqué dans la maintien de l'homéostasie intestinale

L'autophagie (du grec « autodigestion ») est un mécanisme mis en évidence en 1963 par De Duve. D'abord caractérisé comme une forme de mort cellulaire, ce mécanisme a été depuis défini comme un processus de maintien de l'homéostasie cellulaire (Benbrook & Long, 2012). Dans des conditions physiologiques, l'autophagie a de nombreux rôles vitaux comme le maintien du « pool » des acides aminés pendant la famine, le développement préimplantatoire, la prévention de la neurodégénérescence, la suppression tumorale, la clearance des pathogènes intracellulaires et la régulation de l'immunité innée et adaptative. L'autophagie permet également le maintien de l'homéostasie cellulaire lors de circonstances stressantes comme l'hypoxie, le stress du réticulum endoplasmique (RE) ou encore la prise d'agents pharmaceutiques.

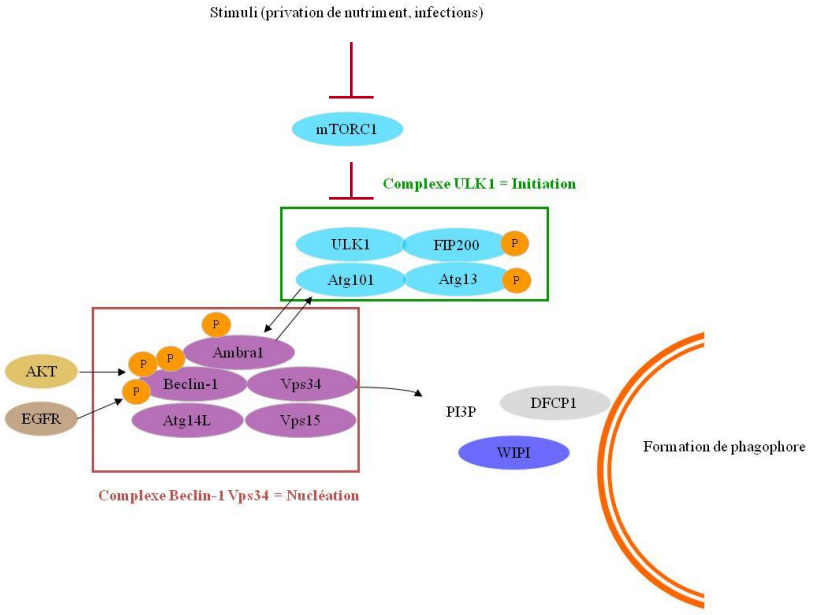
Il existe trois classes d'autophagie distinctes (figure 15) : la microautophagie, l'autophagie réalisée grâce à des protéines chaperonnes (CMA) et la (macro-) autophagie (Mizushima & Komatsu, 2011). Dans la microautophagie, l'invagination de la membrane du lysosome piège directement une portion du cytoplasme. A l'inverse, la CMA implique des protéines telles que Hsc70 pour cibler les substrats à éliminer. La (macro-) autophagie est le principal type d'autophagie. De part son importance, seule la (macro-) autophagie vous sera présentée et sera nommée plus simplement autophagie (J. Zhang, 2013).

1) Mécanismes moléculaires de l'autophagie

L'autophagie se divise en 4 étapes successives (figure 16) : l'initiation, la nucléation, la maturation et la fusion. Le processus d'autophagie est finement contrôlé de l'initiation à la terminaison par l'activité coordonnée de plusieurs acteurs. A ce jour, plus de 30 protéines relatives à l'autophagie (Atg) ont été identifiées et caractérisées. Les gènes codant pour les Atg ont initialement été découverts chez les bactéries et sont hautement conservés au cours de l'évolution.

L'*initiation* de l'autophagie est permise par la déphosphorylation de la protéine kinase ULK1. Le complexe ULK1 comprenant ULK1, Atg13 (protéine de l'autophagie), Atg10 et FIP200 se dissocie de mTORC1 (*inhibitor of mammalian target of rapamycin*). ULK1 est alors actif et

1. Induction et 2. nucléation



3. Maturation

4. Fusion

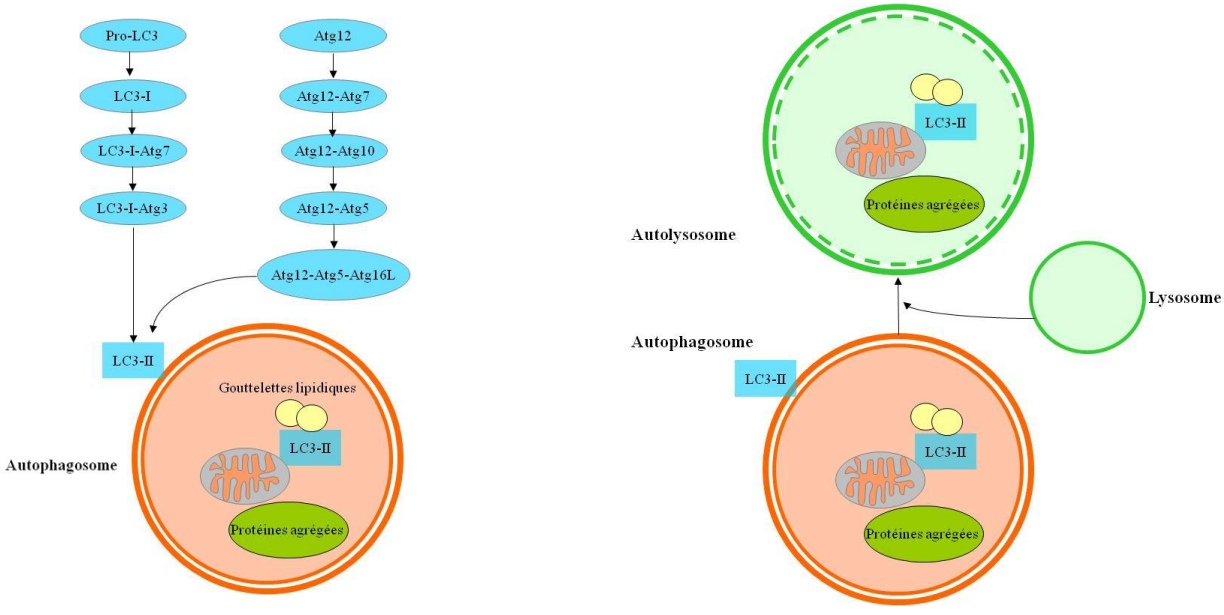


Figure 16. Le mécanisme cellulaire de l'autophagie .

L'autophagie est régulée par de nombreuses voies de signalisation. Des stimuli comme la privation de nutriment active le complexe ULK1 qui conduit à l'augmentation du complexe Beclin-1- Vcp34 via la phosphorylation de Ambra1 et Beclin-1. La phosphorylation de Ambra1 est permise par TRAF6, celle de Beclin-1 est possible par AKT et EGFR *(Epidermal Growth Factor Receptor*). PI3p produit par Vps34 (*vesicular protein sorting 34*) recrute WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) et DFCP1 qui promeuvent le formation du phagophore. L'élongation de l'autophagosome est médié par deux systèmes ATG12-ATG5-ATG16L et LC3-II (LC3-I conjugué avec une phosphatidylethanolamine). Après la synthèse de la vésicule autophagique , l'autophagosome mature fusionne avec un lysosome créant un autolysosome où les protéines agrégées et les organites endommagés sont détruits.

Abréviations: P= phosphate; PI3P= phosphatidylinositol-3-phosphate; LC3-II= LC3-PE= LC3-phosphatylethanolamine

phosphoryle Atg13 et FIP200 débutant le processus d'autophagie. Le complexe ULK1 recrute par phosphorylation de Ambra1, le complexe Beclin-1- Vps 34 (*vesicular protein sorting 34*), acteur de la *nucléation* (Russell et al., 2013). AKT (*protein kinase B*) et EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) module l'autophagie indépendamment de mTORC1, par la phosphorylation de Beclin-1 (R. C. Wang et al., 2012; Wei et al., 2013) Ensuite, le phosphatidylinositol-3- phosphate produit par Vps34 recrute deux protéines effectrices (DFCP1 et WIPI) initiant la formation de la double membrane qui constitue le phagophore (Axe et al., 2008).
L'AMPK joue un rôle central dans l'intégration des stimuli pour initier l'autophagie. En effet, LKB1, CaMKKβ et TAK-1 activent l'AMPK en phosphorylant un résidu thréonine de sa sous-unité catalytique. L'AMPK induit l'autophagie par l'inhibition de mTORC1 *via* la phosphorylation de TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) et de Raptor, une protéine régulatrice de mTORC1. L'inhibition de mTORC1 peut également être dirigée par AKT. Ce dernier devient actif par la présence de facteurs de croissance, il phosphoryle alors TSC1/TSC2 et Raptor.

La *maturation* du phagophore et la formation de l'autophagosome requièrent l'expansion de la membrane et sa fusion au lysosome ce qui est régulée par deux réactions du type ubiquitination.
Dans la première réaction, la molécule Atg12 est associée à Atg5 par une réaction impliquant Atg7 et Atg10. Le complexe Atg12-Atg5 interagit avec Atg16L1 (*autophagy like 1*). Atg12-Atg5-Atg16L1 s'associent au phagophore naissant. Il est, par ailleurs, essentiel à l'élongation de la membrane du pré-autophagosome. Cependant, ce complexe sera détaché lorsque l'autophagosome est formé. La seconde réaction est l'association d'une molécule de la famille Atg8 (*microtubule-associated protein 1 light chain* 3 (LC3), GABARAP ou GATE-16) avec un groupement phosphatyléthanolamine (PE).

LC3, le membre le mieux caractérisé de la famille Atg8, est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui est clivé en C-terminal par Atg4B produisant une forme cytosolique de LC3 appelé LC3-I (18 kDa).
LC3-I est également conjugué au PE par Atg3 et Atg7 pour donner la forme LC3-II (22 kDa), elle-même associée à l'autophagosome. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 joue donc le rôle d'une ligase en conduisant LC3 sur le site de lipidation et en stimulant la conjugaison de PE avec LC3-I. LC3-II reste toutefois associé à l'autophagosome. Lorsque que ces derniers sont matures et qu'ils ont séquestrés le matériel cellulaire à détruire à l'aide de leur double

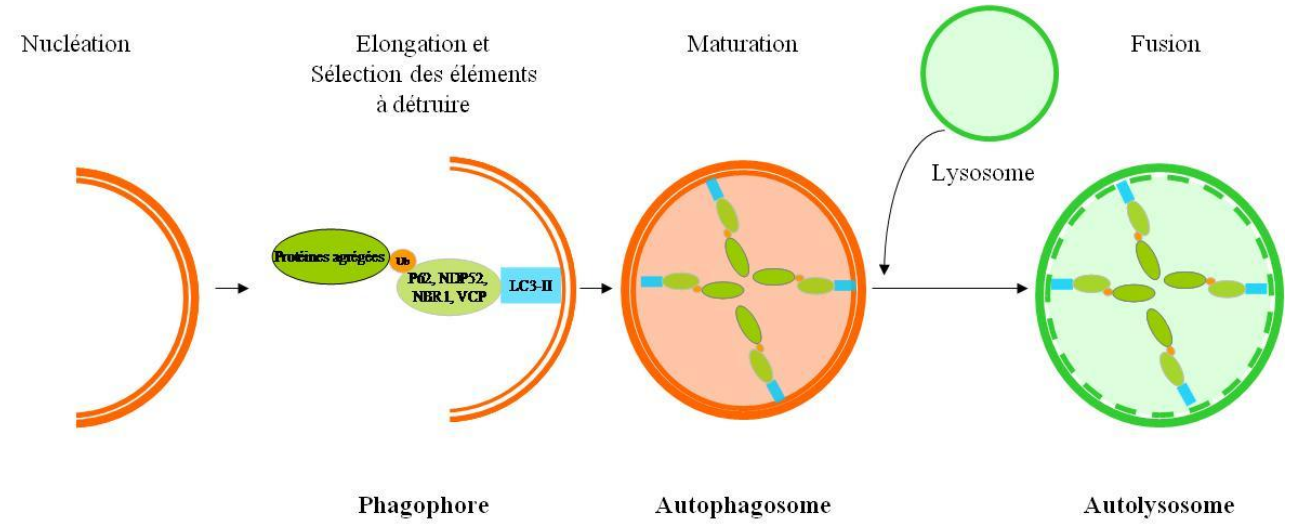


Figure 17. L'autophagie, un mécanisme sélectif.

La formation de l'autophagosome est initiée par la nucléation, puis l'élongation. L'autophagie sélective est permise par des récepteurs/adaptateurs (ici, p62, NDPS2, NBR1 ou VCP) qui lie le susbtrat (ici, protéines agrégées ubiquitinilées) à un membre de la famille ATG8 (ici, LC3-II) fixé à la membrane de phagophore. L'agrégation des substrats avec les récepteurs/adaptateurs est essentielle à une séquestration efficace. La fermeture résulte de la formation d'un autophagosome à double membrane. La fusion avec le lysosome forme un autolysosome où les éléments piégés dans l'autophagosome sont détruits.

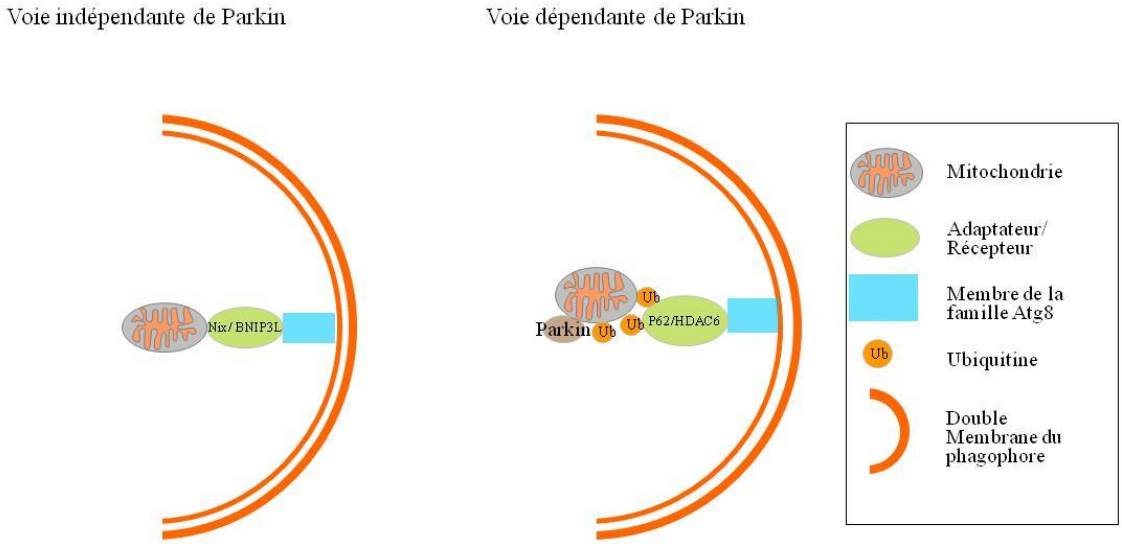


Figure 18. La mitophagie, un mécanisme sélectif.

Nix/BNIP3L est essentiel à la clearance des mitochondries, en recrutant des adaptateurs de la famille Atg8.

Il existe une seconde voie dépendente de l'ubiquitination. PINK1 est rapidement accumulé sur les mitochondries endommagées permettant le recrutement de Parkin. PINK1 interagit avec Parkin pour permettre la translocation de Parkin à la membrane mitochondriale. Parkin conduit à l'ubiquitination VDAC1 de la mitochondrie et au recrutement de p62 et de HDAC6 permettant une dégradation efficace.

membrane close, ils peuvent alors fusionner avec des lysosomes pour former ainsi des autolysosomes. Le matériel cellulaire alors piégé dans l'autophagosome est ensuite digéré par les enzymes lysosomales (cathepsines B, D, C et L).
Après la fusion de l'autophagosome au lysosome, LC3-II contenu dans le lysosome est dégradé. Dans le cytoplasme, LC3-II est « delipidé » par un processus dépendant de Atg4 (Moreau, Renna, & Rubinsztein, 2013).

a) Mécanisme cellulaire sélectif :

Pendant longtemps l'autophagie a été considérée comme un mécanisme non sélectif. Cependant des études récentes mettent en lumière l'élimination sélective par l'autophagie des composants cellulaires endommagés comme les agrégats protéiques, les gouttelettes lipidiques, les organites dysfonctionnels et les pathogènes (Hubbard, Valdor, Macian, & Cuervo, 2012). En effet, la séquestration des organites et protéines destinés à la dégradation est facilitée par des adaptateurs ou des récepteurs. De plus, les modifications post-traductionnelles jouent un rôle important dans la reconnaissance des éléments à piéger dans l'autophagosome.

Par exemple, l'ubiquitination cible les protéines pour la dégradation protéosomale et autophagique (figure 17). La reconnaissance des protéines ubiquitinilées s'effectue grâce à des adaptateurs tels que p62, NDP52, NBR1, VCP qui se fixent à l'ubiquitine portée par la protéine et aux protéines spécifique de l'autophagosome comme celles de la famille Atg8 (Johansen & Lamark, 2011).

b) Mitophagie : Autophagie sélective des mitochondries

L'autophagie maintient l'homéostasie en permettant la suppression des mitochondries dysfonctionnelles dans un processus sélectif appelé mitophagie. Le processus complexe d'élimination des mitochondries surnuméraires ou endommagées a été récemment mis en évidence. La perte du potentiel membranaire mitochondriale ou la production de ROS induisent la dégradation mitophagique (I. Kim, Rodriguez-Enriquez, & Lemasters, 2007).

Deux voies sont possibles :
i) Nix/BNIP3L est essentiel à la clearance des mitochondries, en recrutant des adaptateurs de la famille Atg8 (figure 18). Dans un modèle murin, la suppression de Nix/BNIP3L a une conséquence négative puisqu'elle conduit à une dégradation ralentie des mitochondries.

ii) De nombreuses études ont également démontrées une seconde voie dépendante de l'ubiquitination. Richard et *al.* fournissent la preuve du rôle de Parkin dans le processus d'élimination des mitochondries endommagées en réponse à un traitement avec des ROS exogènes.
Ils montrent, en effet, que PINK1 s'accumule rapidement sur les mitochondries endommagées permettant le recrutement de Parkin mais aussi que PINK1 interagit avec Parkin pour permettre la translocation de Parkin à la membrane mitochondriale. Le groupe de Tso-Pang Yao met en évidence que Parkin conduit à l'ubiquitination de VDAC1 (*voltage-dependent anion channel 1*) de la mitochondrie et au recrutement de p62 et de HDAC6 permettant ainsi une dégradation efficace.

2) Les signaux inducteurs de l'autophagie

L'autophagie est induite par divers conditions stressantes comme la privation de nutriments et d'énergie, le stress du RE, la reconnaissance de motifs bactériens (PAMPs), l'hypoxie, le stress oxydant et les dommages mitochondriaux.

Dans la majorité des cultures cellulaires de mammifères, l'autophagie est induite en quelques minutes en l'absence de nutriments (acides aminés et glucose) et de facteurs de croissance (contenus dans le sérum des milieux de culture).

Le stress du RE stimule également l'autophagie. Bip/GRP78 (*78 kDa glucose-regulated protein*) est une protéine chaperonne qui lors d'un stress du RE s'associe aux protéines mal enchevêtrées. Pour cela, Bip se dissocie préalablement des protéines auxquelles elle était associée : PERK, ATF6 et IRE1. PERK et ATF6 stimulent l'autophagie alors que IRE1 régule négativement cette dernière. PERK augmente la transcription de LC3 et ATG5.

Lors de la production de ROS, de dommage de l'ADN ou de reconnaissance de pathogènes par les PPRs (*pattern recognition receptors*), on note une augmentation de l'autophagie *via* deux voies : une dépendante et l'autre indépendante de NFκB. Les différents stimuli conduisent à l'activation du complexe IKK (une sous-unité régulatrice et deux sous-unités catalytiques) qui phosphoryle IκB. Cela amène à l'activation de NFκB et l'induction de l'autophagie. IKK peut également activer AMPK et JNK1 indépendamment de l'activation de NFκB.

L'hypoxie (concentration en oxygène < 3%) et l'anoxie (concentration en oxygène < 0,1%) conduisent à l'autophagie par des mécanismes dépendants ou non du facteur de transcription

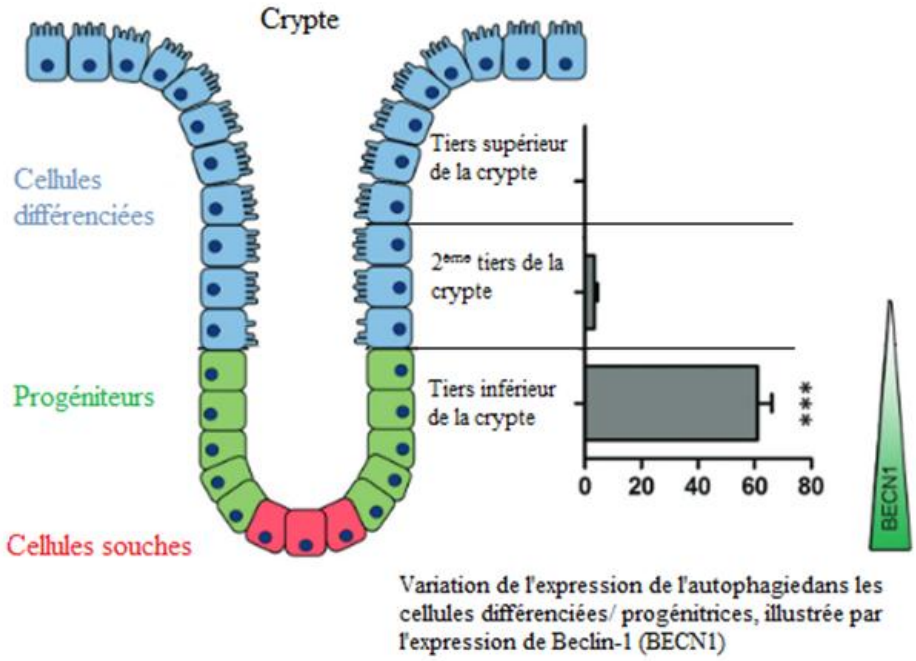


Figure 19. Expression de l'autophagie dans la muqueuse du colon.

L'épithélium intestinal est en perpétuel renouvellement, il contient des cellules souches dans la partie inférieure des cryptes. En se divisant, elles donnent naissance à des cellules progénitrices qui prolifèrent et se différencient. Les cellules différenciées sont présentes dans la partie supérieure des cryptes. L'équipe de Beaulieu a mis en évidence une expression de l'autophagie variant le long des cryptes selon l'état de différenciation des cellules.
Beclin-1 (BECN1) initie la nucléation de la double membrane formant le phagophore. Cette protéine est utilisée comme une marqueur de l'autophagie. Une augmentation de cette dernière corrèle avec une augmentation de la protéine.
D'après Jean-François Groulx (2012).

HIF (*Hypoxia-inducible factor*). HIF provoque la transcription de BNIP3 et de NIX, qui conduisent à la dégradation sélective des mitochondries. L'autophagie induite par l'hypoxie peut également inclure DJ-1, AMPK lors d'un stress du RE ou du stress oxydant. Lors d'une accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), les mitochondries endommagées sont éliminées par mitophagie.

3) Autophagie et homéostasie cellulaire

Au niveau des cryptes intestinales et du côlon humain, l'autophagie est active dans les régions contenant des cellules progénitrices ou des cellules souches qui sont essentielles au renouvellement de l'épithélium. Par immunofluorescence, la distribution de la Beclin-1 a été étudiée. Elle est concentrée dans les cellules non-differenciées et présentes au fond des cryptes. A l'inverse, la Beclin-1 n'est pas observée dans les deux tiers supérieurs de la crypte contentant des cellules différenciées (figure 19). Une des hypothèses est que l'autophagie joue un rôle cytoprotecteur pour les cellules en différenciation. Ce phénomène prévient des dommages de l'ADN qui conduirait au développement de cellules épithéliales malignes (Groulx, Khalfaoui, Benoit, Bernatchez, & Carrier, 2012).

Cependant, l'autophagie est également observée dans les cellules différenciées permettant une résistance qui prévient de la mort cellulaire. Ce mécanisme permet donc le maintien de l'intégrité cellulaire en générant des précurseurs métaboliques et en dégradant les débris cellulaires. Ce processus participe ainsi au renouvellement des mitochondries (mitophagie), à la régulation du métabolisme lipidique (lipophagie) et à la dégradation des organites cellulaires endommagés mais aussi à la clearance des agrégats protéiques (aggrephagie). Par ailleurs, l'autophagie permet aussi la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire.

4) Autophagie et inflammation

a) Régulation de la production de cytokines

Saitoh et *al*. mettent en évidence le rôle des protéines de l'autophagie, Atg, dans la régulation de cytokines inflammatoires en utilisant des cellules souches hépatiques issues d'embryon (E15.5) de souris sauvages ou déficientes en ATG16L1 (A*utophagy 16 like 1*). Ce gène code pour la protéine Atg16L1 permettant l'induction de l'autophagie. Ces cellules sont cultivées

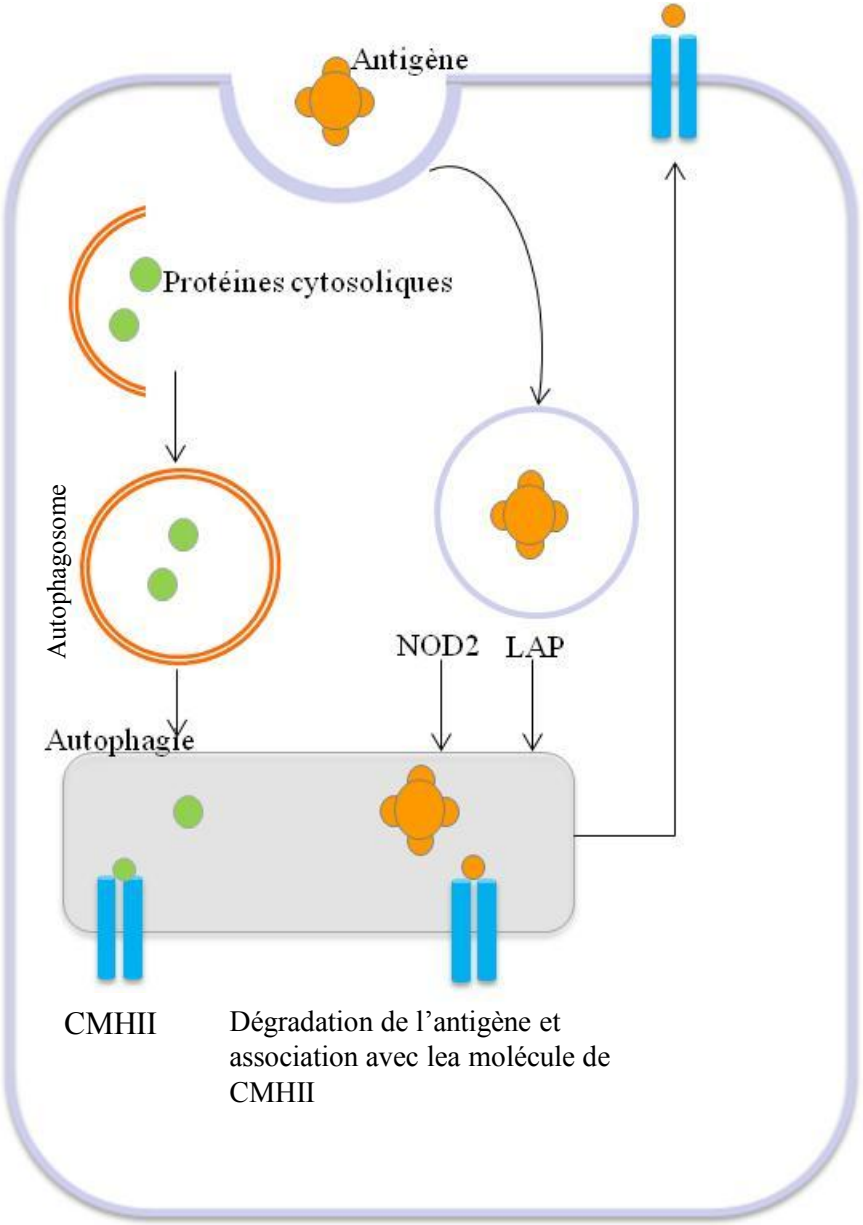


Figure 20. Rôle de l'autophagie dans l'immunité adaptative.

La première fonction antimicrobienne de l'autophagie est la xénophagie qui séquestre les micro-organismes dans une structure à double membrane (un autophagosome) et le second est la phagocytose associée à LC3 (LAP). Ce mécanisme permet de présenter des antigènes extracellulaires phagocytés et séquestrés dans une vésicule, avant l'activation de l'autophagie. NOD2 stimule également la présentation de l'antigène. L'autophagie permet d'augmenter la présentation d'antigène par le complexe d'histocompatibilité majeur de classe II (CHMII).

pendant 7 jours dans un milieu GM-CSF pour générer des macrophages de foie. Ensuite ces macrophages déficients ou non en Atg16L1 sont incubés avec du LPS, un ligand de TLR4 (*Toll like receptor 4*). Il est alors observé :
i) une hausse de la production d'IL-6 et de TNFα indépendante de l'expression d'Atg16L1
ii) une augmentation importante de la sécrétion d'IL-1 en absence d'Atg16L1.
Cependant le taux d'ARNm d'IL-1 et de la protéine pro-IL-1 est inchangé. Les protéines de l'autophagie régulent donc négativement le processus post-transcriptionnel d'IL-1 (Saitoh & Akira, 2010).

In vivo, il est difficile d'analyser la fonction d'Atg16L1 puisque les souris déficiente en Atg16L1 décèdent 1 jour après la mise bas suggérant que cette protéine est nécessaire pour la survie durant la privation néonatale. L'étude *in vivo* du rôle d'Atg16L1 dans l'inflammation intestinale est permis par la mise en place d'un modèle murin chimérique traité au dextran sulfate sodium (DSS). Les cellules hématopoïétiques de souris $ATG16L^{-/-}$ sont implantées dans des souris sauvages irradiées. Il est observé une perte de poids importante et une diminution de la survie chez les souris chimériques comparées aux souris $ATG^{+/+}$. De plus, on note une augmentation de la production d'IL-1 et IL-18. Il a également été décrit que la production d'IL-1 conduit à l'activation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique impliqué dans l'immunité innée. L'altération d'Atg16L1 conduit donc à la production excessive de cytokines et à l'activation de l'inflammasome. Ce processus induit le développement de colite.

Les mécanismes par lesquels l'autophagie régule l'activation de l'inflammasome ne sont pas encore entièrement compris. Cependant il a été mis en exergue que les protéines de l'autophagie régulent négativement la formation de l'inflammosome par l'inhibition des composants de ce dernier.

b) Régulation de la réponse immunitaire adaptative

Enfin, l'autophagie joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative en permettant la présentation de l'antigène et le développement, la différenciation et l'homéostasie des lymphocytes B et T. L'autophagie est essentielle à la présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II porté par les cellules dendritiques (figure 20). Cela permet par exemple d'augmenter l'efficacité de la vaccination (Deretic, Saitoh, & Akira, 2013).

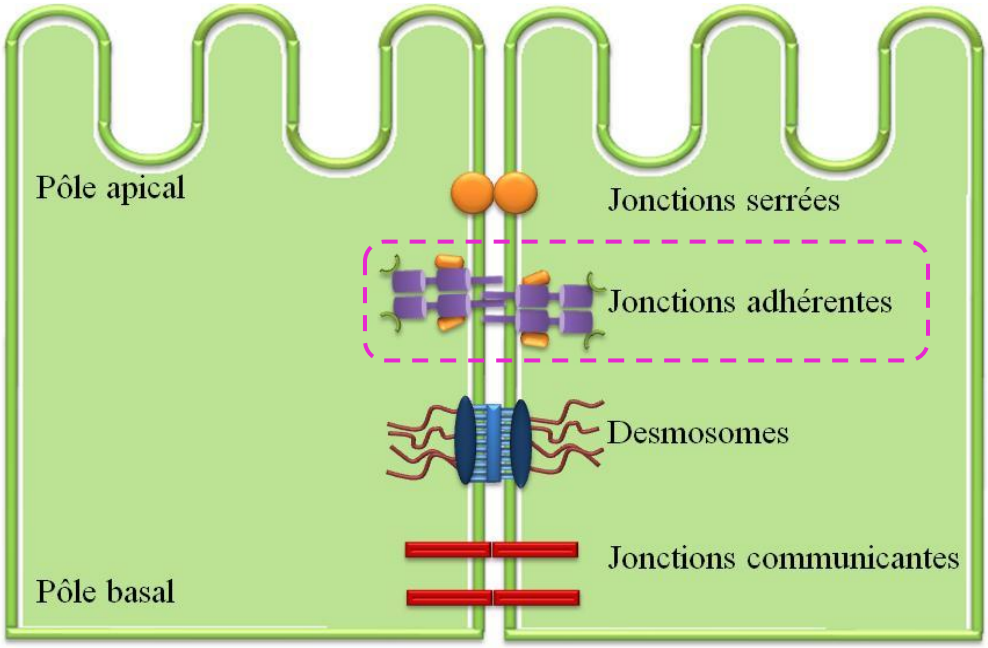


Figure 21. Les différents types de jonctions au niveau des cellules épithéliales intestinales.

On distingue du pôle apical au pôle basal quatre types de complexes intercellulaires : les jonctions serrées (JS), les jonctions adhérentes (JA), les desmosomes et les jonctions communicantes.

IV. Rôle de barrière : importance des systèmes d'adhérence

La fonction de barrière épithéliale intestinale est assurée par l'établissement, au sein des cellules épithéliales, d'interactions de type cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC). Ces interactions sont permises par des complexes multiprotéiques qui s'associent au cytosquelette des cellules. Ces interactions demandent la participation de nombreux acteurs cytoplasmiques (protéines structurales, enzymes) assurant la régulation des jonctions et permettant la transduction de signaux intercellulaires puisque ces structures constituent également des plateformes de signalisation.

1) Les jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires permettent aux cellules épithéliales intestinales (IEC) d'assurer l'étanchéité de l'épithélium et de contrôler le passage sélectif des nutriments à travers les entérocytes. Elles participent également au rôle de barrière de l'épithélium. La perte ou l'altération de ces jonctions intercellulaires est impliquées dans différentes pathologies digestives comme les MICI et dans divers cancers du tube digestifs (Birchmeier, Hülsken, & Behrens, 1995; Hirohashi & Kanai, 2003).
On distingue quatre types de complexes intercellulaires du pôle apical au pôle basal : les jonctions serrées (JS), les jonctions adhérentes (JA), les desmosomes et les jonctions communicantes (figure 21).

Une présentation succincte de chaque type de jonction intercellulaire sera réalisée. La structure moléculaire ainsi que la dynamique des JA seront développées.

a) Les jonctions serrées (JS) ou Zonula Occludens

Les jonctions serrées assurent la mise en place de la polarité cellulaire permettant de définir deux domaines fonctionnellement distincts de la membrane plasmique : le pôle apical et le pôle basal. Ces jonctions sont essentiellement formées de protéines transmembranaires nommées occludines, claudines, tricellulines (qui se concentrent au point de rencontre de trois cellules) et JAM (*Junctional Adhesion Molecule*), liées dans le cytoplasme aux filaments d'actine par le biais de protéines structurale comme les protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) ou Disc Large et la cinguline (Förster, 2008; Schneeberger & Lynch, 2004). Seule ZO-1 est exprimée dans l'intestin. Ces protéines sont caractérisées par trois domaines

PDZ qui interagissent avec les occludines et les claudines et un domaine C-term qui s'associe à l'actine cortical.

Les occludines ont été les premières protéines associées aux JS identifiées. Leur extonction génique conduit au développement intact des JS et n'induit pas d'altération de la barrière épithéliale. Cependant des expériences *in vitro* mettent en évidence un rôle majeur des occludines dans l'assemblage et la maintenance des JS.
La protéine JAM interagit de façon homophilique avec les cellules voisines. Les souris déficiente en JAM-1 présentent une augmentation de la perméabilité et une susceptibilité à l'inflammation induite par le DSS (Laukoetter et al., 2007; Su et al., 2009).
Il existe une vingtaine d'isoformes dont la modification du pattern régule la fonction de barrière (transport paracellulaire). Les claudines 1 à 5 et 7, 8, 12, 13 et 15 sont exprimées dans l'intestin (H. Fujita et al., 2006). L'augmentation et la diminution de l'expression de la claudine 2 et de la claudine 8 respectivement corrèlent avec l'accroissement de la perméabilité (Zeissig et al., 2007). Tandis que l'augmentation de la claudine 4 permet de renforcer les JS (Kuo et al., 2006). Le KO de la claudine 5 conduit à un « méga-intestin » où il est observé une hyper-prolifération au niveau des cryptes. Les claudines induisent une signalisation impliquée dans la morphogenèse. Chez les patients MICI, on note une absence des claudines 3, 4, 5 et 8 et une augmentation de la claudine 2 au niveau des JS (Edelblum & Turner, 2009).

Les protéines transmembranaires impliquées dans les JS forment des pores. La taille de ces derniers définit la perméabilité para-cellulaire, i.e le passage sélectif entre les cellules épithéliales intestinales de molécules en fonction de leur taille et de leur charge (Tsukita, Furuse, & Itoh, 2001).

b) Les desmosomes

Les desmosomes impliquent des cadhérines spécifiques appelées desmogléines et desmocolines reliées aux filaments intermédiaires *via* les protéines de la plaque nommées les plakoglobines (γ-caténine) et les plakophilines. Ces structures sont reconnaissables au microscope électronique par la présence de deux plaques desmosomales, très réfringentes aux électrons, formées par les différentes protéines de la jonction. Cette apparence ainsi que leur fonction d'adhérence leur a donné le surnom de « boutons pression » qui permettent aux IEC de résister aux forces de pression et de tiraillement (Garrod, Merritt, & Nie, 2002). La perturbation de l'adhérence desmosomale contribue au développement de pathologies

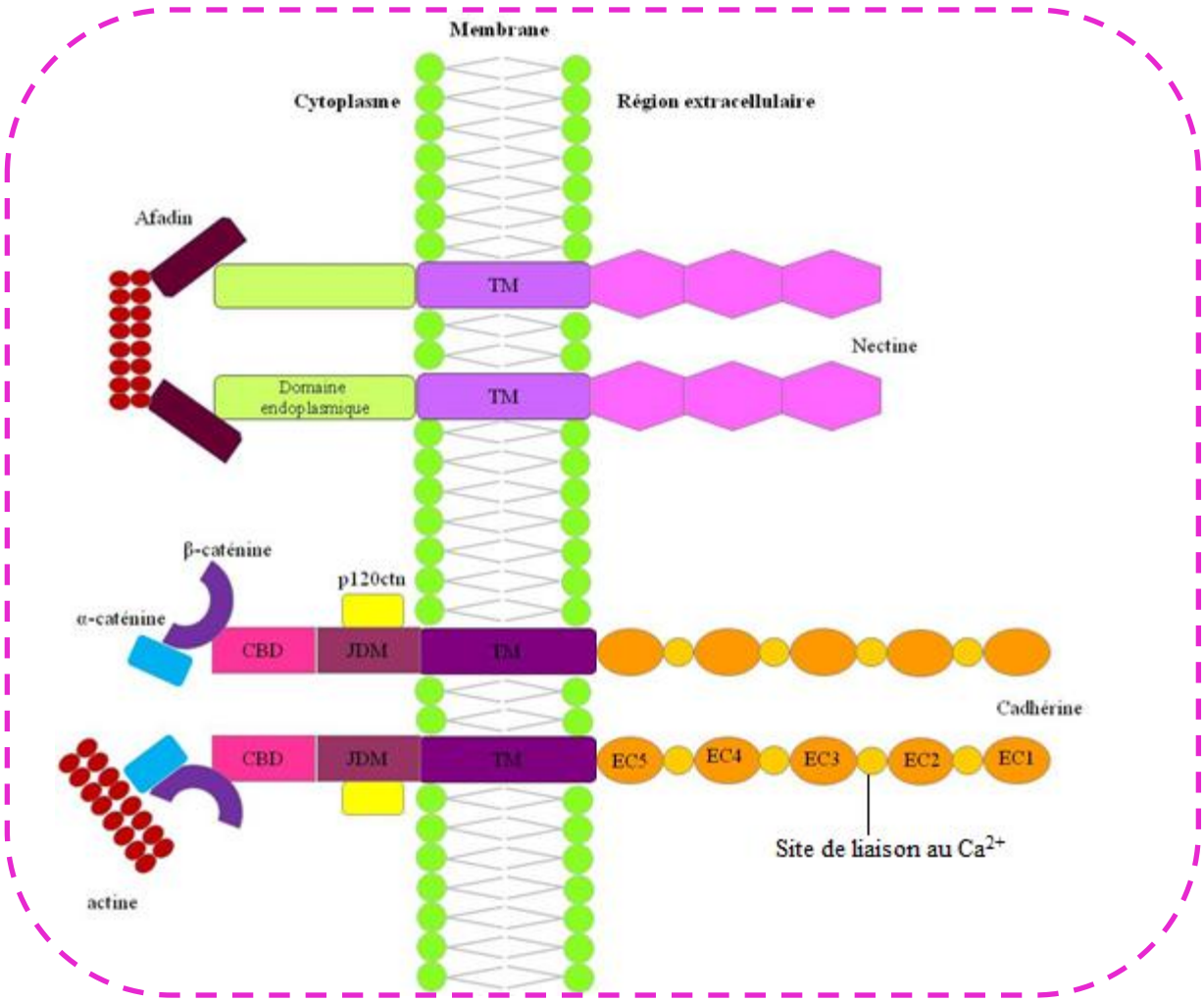


Figure 22. Structure des jonctions adhérentes ca^{2+}.

En haut : Les nectines sont des molécules d'adhérence qui contribuent à la formation et au maintien des jonctions adhérentes des cellules. Cette famille est constituée de quatre membres (nectine 1 à 4) avec une structure similaire. Le fragment extracellulaire composé de trois domaines de type Ig-*like*, un de type V et deux de type C2, sont responsables des interactions *cis* et *trans* homophiliques et hétérophiliques des nectines.
En bas : Les cadhérines de type I sont composées de trois domaines:
*un fragment extra-cellulaire comportant 5 ectodomaines (EC1-EC5)
*un fragment transmembranaire
*un domaine cytoplasmique: le domaine juxta membranaire (JMD) adjacent au fragment transmembranaire et le fragment c-term (CBD). Le JMD s'associe avec la p120 caténine (p120ctn). Le CBD se lie à la béta-caténine (β-caténine) qui recrute l'alpha-caténine (α-caténine) et l'actine.

cardiaques ou cutanées (pemphigus) où les tissus sont soumis à de fortes contraintes mécaniques (Uitto, Richard, & McGrath, 2007; Waschke, 2008).

c) Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont les plus basales et permettent aux IEC de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques. Ces jonctions sont composées de connexines pouvant former des hexamères nommés connexons. Les connexons de deux cellules épithéliales voisines peuvent s'associer et former ainsi des canaux ou nexus qui peuvent être ouverts ou fermés selon l'état de phosphorylation des connexines (Prochnow & Dermietzel, 2008).

d) Les jonctions adhérentes (JA) ou Zonula Adherens

Les jonctions adhérentes sont les premières a être mises en place. Elles permettent le maintien de la morphologie des cellules adjacentes (Jamora & Fuchs, 2002). Les cadhérines constituent une super famille de molécules d'adhérence dépendante du calcium. Il existe environ 100 membres de cette famille (Takeichi, 1990; Wheelock and Johnson, 2003a; Goodwin and Yap, 2004; Hulpiau & van Roy, 2009). Les cadhérines peuvent s'associer à des protéines de même type (interactions homophiliques) ou à des protéines de nature différentes (interactions hétérophiliques) portées par les cellules voisines (Foty & Steinberg, 2005; Gumbiner, 2000). La liaison entre les domaines extracellulaires des cadhérines est relativement faible. Cette adhérence cellule-cellule peut être renforcée par l'association latérale de cadhérines assurées par des liaisons entre le domaine cytoplasmique de la cadhérine et le cytosquelette d'actine (Jamora & Fuchs, 2002).

Il existe six sous-type de cadhérines: le type I (ou cadhérine classique), le type II, la desmocolline, la desmogléine, les protocadhérines, la Flamingo cadhérine (Nollet, Kools, & van Roy, 2000). Les cadhérines se différencient de par leurs structures et de par leurs fonctions. De plus, leurs interactions influencent la réponse biologique dans diverses voies. Chez les mammifères, les JA se composent de cadhérines classiques (environ 20 membres) qui partagent une organisation commune (figure 22) (pour revue (Niessen, 2007)). Elles sont pourvues d'une région extracellulaire N-terminale également appelée ectodomaine, d'un segment transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique hautement conservé qui possède également des sites de liaison pour les caténines (β-caténine et p120ctn) (Boggon et al., 2002).

La β-caténine recrute l'α-catenine, ce qui permet une interaction entre le complexe cadhérine-caténine et le cytosquelette d'actine (Horikawa, Radice, Takeichi, & Chisaka, 1999). L'adhérence est permise par le domaine extracellulaire, tandis que la séquence cytoplasmique régule la signalisation, le renouvellement et module l'assemblage de l'actine (Nelson & Nusse, 2004a;Masatoshi Takeichi, 2007).

i. Interactions entre les cadhérines voisines : rôle du domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine forme principalement des liaisons homophiliques avec la E-cadhérine des cellules voisines (Foty & Steinberg, 2005; Gumbiner, 2000). Il est divisé en cinq motifs identiques (noté EC pour *extracellular repeats domain*) d'approximativement 110 acides aminés (Overduin et al., 1995).
Le motif EC1, le plus distant de la membrane plasmique contient une séquence très conservée His-Ala-Val (HAV), nécessaire à la reconnaissance et à l'interaction homophilique entre deux cadhérines (Blaschuk, Sullivan, David, & Pouliot, 1990).
Les motifs EC sont séparés les uns des autres par des sites de fixation du calcium qui contrôlent la fonction d'adhérence des JA en modifiant la conformation du domaine extracellulaire (Pokutta, Herrenknecht, Kemler, & Engel, 1994).
En 2010, Hong et ses collègues mettent en exergue que la formation des JA n'est pas dirigée par le domaine cytoplasmique, mais que le fragment essentiel à ce processus est le domaine extracellulaire (S. Hong, Troyanovsky, & Troyanovsky, 2010).

L'adhérence entre cellules est un mécanisme dynamique généré par la formation de deux interactions distinctes entre les cadhérines :
i) portées par la même cellule (interaction *cis*)
ii) portées par des cellules voisines (interaction *trans*).
Chieng et ses collègues ont montré que l'association de deux cellules opposées nécessitent deux étapes: une étapes initiale rapide induisant la formation de *trans*-dimère, une seconde étape plus lente : l'adhérence en *cis* (Chien et al., 2008).
Ces résultats ont été corroborés par des analyses théoriques réalisées en 2011 (Wu, Vendome, Shapiro, Ben-Shaul, & Honig, 2011). Alors que la dimérisation en *trans* est bien établit, l'existence et la fonction des dimérisations en *cis* restent à élucider.
Des observations aux rayons X suggèrent que l'interaction entre l'apex de EC1 et de la base de EC2 et EC3 de la cadhérine adjacente induit la dimérisation en *cis* (Boggon et al., 2002;

Harrison et al., 2011). En présence de calcium, les domaines extracellulaires des cadhérines sont rigides favorisant la formation d'interaction *trans* (Chitaev, Averbakh, Troyanovsky, & Troyanovsky, 1998; Pokutta et al., 1994). Lorsque la dimérisation *trans* est mise en place, la flexibilité est nettement réduite ce qui diminue l'énergie entropique nécessaire à la formation des interactions *cis* (Wu et al., 2011).

Des expériences de mutations, d'analyses structurales et de manipulations cellulaires ont montré que les dimères de E-cadhérine sont stabilisés par trois interactions.
i) Une de ces interaction est l'insertion du tryptophane (Trp2) dans une poche hydrophobe d'une autre cadhérine (Boggon et al., 2002; Häussinger et al., 2002; Parisini, Higgins, Liu, Brenner, & Wang, 2007; Shapiro, Fannon, Kwong, Thompson, Lehmann, Grubel, 1995).
ii) La seconde interaction est permise par la réaction du groupement $NH3^+$ et le groupement carboxyle du résidue Glu (Harrison, Corps, & Kilshaw, 2005).
iii) Enfin, la dimérisation est induite par la mise en place de liaisons hydrogènes entre Asp1 et Asn27 et Trp2 et Asp90.

ii. Interactions du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine

Bien que le domaine cytoplasmique ne soit pas essentiel à la formation de dimères lors de la formation des contacts intercellulaires ; cette région joue un rôle dans la transduction du signal relatif à l'adhérence (Harrison et al., 2011; S. Hong et al., 2010). Ce fragment est divisé en deux sous domaines fonctionnels qui interagissent avec les caténines: le domaine juxtamembranaire (JMD) interagit avec la p120ctn (Yap, Niessen, & Gumbiner, 1998) et le domaine C-term appelé *catenin-binding domain* (CBD) qui s'associe avec la β-caténine ou avec la plakoglobine (A. H. Huber, Weis, & West, 2001; Ishiyama et al., 2010).

iii. Interactions avec la β-caténine

La β-caténine régule l'adhérence cellule-cellule par l'association avec les cadhérines mais aussi la transcription de gènes en étant un acteur de la voie de signalisation de Wnt (Behrens et al., 1996) (pour revue (Cadigan & Peifer, 2009; Clevers & Nusse, 2012)). La β-caténine favorise l'adhérence des cadhérines par deux mécanismes :

i) en prévenant la dégradation de la cadhérine et en régulant la transport de la cadhérine du RE à la membrane (Y. T. Chen, Stewart, & Nelson, 1999)
ii) en augmentant la stabilité de la cadhérine à la membrane plasmique en recrutant l'α-caténine (Miyashita & Ozawa, 2007; Troyanovsky, Klingelhöfer, & Troyanovsky, 2011). Par cette liaison, le complexe protéique s'associe au cytosquelette (H Aberle et al., 1994).
L'affinité entre la E-cadhérine et la β-caténine est influencée par l'état de phosphorylation des deux protéines : elle est augmentée lors de la phosphorylation de sérines au niveau du CBD alors qu'elle est diminuée lors de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β-caténine (a H. Huber & Weis, 2001).
Lorsque la β-caténine n'est pas associée avec la E-cadhérine, elle est prise en charge par le complexe multiprotéique APC/ axine/ GSK3 dans le cytoplasme et elle est ensuite dégradée par le protéasome (H Aberle, Bauer, Stappert, Kispert, & Kemler, 1997). Lors de l'activation de la voie Wnt, elle s'associe au facteur de transcription TCF4 et active des gènes pro-prolifératifs comme Myc et cycline D1 (He et al., 1998; Tetsu & McCormick, 1999) ainsi que MT1-MMP (*Membrane Type 1 Metalloprotease*) et LAMC2 (*Laminin-5γ-2*) associés à l'invasion (Bienz, 2005; Sánchez-Tilló et al., 2011).

iv. Interactions avec p120 caténine (p120ctn)

La p120 caténine (p120ctn) fut originalement décrite comme un substrat de la tyrosine kinase src (A. B. Reynolds, Roesel, Kanner, & Parsons, 1989).
Elle possède 9 domaines Armadillo (Riggleman, Schedl, & Wieschaus, 1990) qui facilitent l'interaction entre protéines (Hatzfeld, 1999) comme les cadhérines de type I et II *via* leur domaine juxtamembranaire (Finnemann, Mitrik, Hess, Otto, & Wedlich, 1997; Mo & Reynolds, 1996; Yap et al., 1998).
p120ctn est codée par le gène CTNND1 composé de 21 exons codant pour 968 acides aminés (Keirsebilck et al., 1998). Ce gène possède quatre sites de transcription différents (1, 2, 3 et 4) ainsi que quatre sites d'épissage (A-D).
Cette diversité dans la régulation transcriptionnelle du gène CTNND1 est à l'origine de 64 isoformes différentes dont l'expression est dépendante du contexte et du tissu (Aho, Rothenberger, & Uitto, 1999; Keirsebilck et al., 1998). En effet, les isoformes 1 et 3 sont les plus abondantes : l'isoforme 1 est retrouvée dans les cellules motiles comme les cellules mésenchymateuses. Alors que l'isoforme 3 est caractéristique des cellules épithéliales. Ces observations suggèrent que les différentes isoformes exercent des fonctions variables. La

diversité des fonctions est augmentée par les différences de localisation (noyau, cytoplasme, membrane plasmique) et leur état de phosphorylation (dépendant des résidus sérine/ thréonine et tyrosine composant chaque isoforme).

p120ctn membranaire

A la membrane plasmique, le partenaire majeur de p120ctn est la E-cadhérine conduisant à la stabilisation et la maturation des JA (Daniel & Reynolds, 1995; Thoreson et al., 2000). La diminution de l'expression de p120ctn conduit à l'exposition d'un motif dileucine (L743-744), responsable de l'internalisation des cadhérines et réduit le taux de cadhérine disponible pour former des contacts intercellulaires. De plus, p120ctn entrave physiquement l'interaction des cadhérines avec la ligase E3 et évite l'ubiquitination des cadhérines à la membrane plasmique ou après son endocytose. Ce mécanisme détermine le devenir de la E-cadhérine qui est soit recyclée à la membrane soit dirigée vers la dégradation lysosomale (développé dans la sous-partie « viii. régulation du désassemblage des jonctions adhérentes »)(Y. Fujita et al., 2002; Hartsock & Nelson, 2012; Palacios, Tushir, Fujita, & D'Souza-Schorey, 2005).

L'association de la p120ctn aux cadhérines peut réguler négativement l'adhérence intercellulaire en recrutant par exemple la preseniline (PSEN1). Cette sécrétase conduit à la libération du fragment c-term de la E-cadhérine et induit le désassemblage de la JA (Baki et al., 2001; Marambaud et al., 2002; Spasic & Annaert, 2008). La dégradation des JA peut également être facilitée par l'interaction de NUMB avec p120ctn. Cette association induit l'endocytose des composés des JA par un processus dépendant de la clathrine (K. Sato et al., 2011; Z. Wang & Li, n.d.; Z. Wang, Sandiford, Wu, & Li, 2009).

p120ctn cytoplasmique

Lorsque p120ctn n'est pas associée à la E-cadhérine, elle est relarguée dans le cytoplasme mais n'est pas dégradée. p120ctn régule l'activité des protéines G monomériques Rho, Rac et Cdc42 dont les activités modulent la polarité cellulaire, la migration, la formation et la maturation des JA (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

p120ctn interagit directement et inhibe RhoA en agissant comme un Rho-GDI (Castaño et al., 2007) et active Rac et Cdc42 par le biais de Vav2, un facteur d'échange des GTPases (Noren, Liu, Burridge, & Kreft, 2000). Cela induit une morphologie cellulaire caractéristique nommée phénotype dendritique dans les cellules fibroblastiques (Anastasiadis et al., 2000; Grosheva, Shtutman, Elbaum, & Bershadsky, 2001a; Noren et al., 2000) et provoque une augmentation

(en nombre et en taille) des lamellipodes dans les cellules épithéliales pouvant affecter la motilité des cellules (Grosheva, Shtutman, Elbaum, & Bershadsky, 2001b; Yanagisawa et al., 2008).

p120cnt nucléaire

p120ctn est apte à interagir dan le noyau avec les facteurs de transcription Kaiso (ZTBT33) et Glis2 (*Gli-similar protein*) (J M Daniel & Reynolds, 1999; Hosking et al., 2007). Kaiso est un membre de la famille des facteurs de transcription POZ-ZF (*Pox virus and zinc-finger (POZ)- Zinc finger*) qui peuvent se lier à l'ADN méthylé et/ou à des séquences spécifiques (TCCTGCNA) (Juliet M Daniel, Spring, Crawford, Reynolds, & Baig, 2002; Juliet M Daniel, 2007; Donaldson et al., 2012; Prokhortchouk et al., 2001). La fixation de Kaiso au niveau des promoteurs des gènes cibles réprime leur transcription alors que l'association p120ctn-Kaiso lève cette répression transcriptionnelle (Juliet M Daniel et al., 2002).

Certains gènes dont la répression est levée par l'interaction Kaiso-p120ctn comme les gènes codant pour Wnt11, la cycline D1 et la matrilysin sont également des cibles dont la transcription est activée par le complexe β-caténine/ TCF/ LEF révélant la convergence de ces deux voies dans la régulation génique (Juliet M Daniel et al., 2002; J. Y. Hong et al., 2010; S. W. Kim et al., 2004; Park et al., 2006).

Enfin, p120ctn influence le cycle cellulaire en interagissant avec les microtubules et les centrosomes pendant la mitose (Chartier et al., 2007; Franz & Ridley, 2004; Yanagisawa et al., 2004). Ces interactions ont différentes conséquences :

i) transporter p120ctn soit directement soit par le biais des chaines lourdes de kinésines (Franz & Ridley, 2004; Yanagisawa et al., 2004)

ii) favoriser la stabilité des microtubules (Ichii & Takeichi, 2007)

iii) réguler la duplication des centrosomes probablement par le maintien du taux de Cycline E (Chartier et al., 2007; Jiang et al., 2012). p120ctn se lie également avec les protéines CLASP (*Cytoplasmic linker associated protein*), qui permettent l'association et la stabilisation des microtubules avec les JA (Shahbazi et al., 2013).

v. Interactions avec l'α-caténine

L'alpha-caténine (α-caténine) est un acteur principal de la formation des JA et de l'établissement de la polarité cellulaire (Hirano, Kimoto, Shimoyama, Hirohashi, & Takeichi, 1992). L'α-caténine se lie indirectement aux cadhérines par l'interaction avec les acides aminés 118-149 de la β-caténine (Hermann Aberle, Schwartz, Kemler, & Hoschuetzky, 1996; A. H. Huber et al., 2001).
Elle permet également d'associer la JA au cytosquelette d'actine par une liaison directe du domaine C-terminal à la F-actine ou indirectement par le biais de protéines adaptatrices telles que l'afadine. La liaison de l'α-caténine à la β-caténine et à l'actine est mutuellement exclusive. L'α-caténine se lie au JA seulement dans sa forme monomérique pour former un hétérodimère avec la β-caténine (Drees, Pokutta, Yamada, Nelson, & Weis, 2005). Alors que la forme homodimèrique possède une plus forte affinité pour les filaments d'actine. L'association d'α-caténine au JA régule donc négativement l'activité de polymérisation de l'actine (Yamada, Pokutta, Drees, Weis, & Nelson, 2005).

Ainsi les caténines semblent être plus que de simples protéines adaptatrices permettant la formation des JA : ce sont des protéines capables de moduler la force de cohésion des liaisons entre cadhérines, la polymérisation du cytosquelette d'actine et la transcription de gènes. Les caténines permettent donc aux cellules d'interagir avec leur environnement immédiat.

vi. Interactions avec les nectines

Les nectines sont des molécules d'adhérence qui contribuent à la formation et au maintien des JA des cellules (figure 22) (Takai, Ikeda, Ogita, & Rikitake, 2008; Takai, Miyoshi, Ikeda, & Ogita, 2008). Cette famille est constituée de quatre membres (nectine 1 à 4) avec une structure similaire.
Le fragment extracellulaire composé de trois domaines de type Ig-*like*, un de type V et deux de type C2, sont responsables des interactions *cis* et *trans* homophiliques et hétérophiliques des nectines. Les interactions hétérophiliques *trans* avec la E-cadhérine favorisent une adhérence intercellulaire durable. Tandis que les associations homophiliques *trans* facilitent des interactions transitoires avec un haut taux de renouvellement.
La portion intra-cytoplasmique des nectines permet l'interaction indirecte avec le cytosquelette *via* des protéines adaptatrices comme l'afadine. Les nectines initient la

formation des JA (Takai, Irie, Shimizu, Sakisaka, & Ikeda, 2003), puis coopèrent ensuite avec les cadhérines pour stabiliser ces jonctions.

vii. Les jonctions adhérentes et homéostasie intestinale

Le développement, l'organisation et l'homéostasie des tissus animaux et des organes dépendent de la formation des contacts cellule-cellule. L'expression spatio-temporelle de cadhérines durant l'embryogenèse est nécessaire pour la migration, la différenciation cellulaire, et la morphogenèse des tissus.
Après la naissance, les cadhérines sont essentielles dans le maintien de l'architecture tissulaire et la physiologie des tissus matures (Brasch, Harrison, Honig, & Shapiro, 2012; M Takeichi, 1995). L'invalidation de la E-cadhérine est d'ailleurs létal très tôt au cours du développement (Larue, Ohsugi, Hirchenhain, & Kemler, 1994). L'expression d'un mutant de la N-cadhérine dépourvu du domaine extracellulaire (Ncad delta) agit comme un dominant négatif de la E-cadhérine (Hermiston & Gordon, 1995). Cela entraîne une diminution de la E-cadhérine endogène, une altération des interactions cellule-cellule et cellule-MEC, une hausse de la migration le long de l'axe crypto-villositaire, une perte de la polarité cellulaire et une induction précoce de l'apoptose.

Les cadhérines et les JA servent également de plateforme de signalisation pour différents processus impliqués dans l'homéostasie. Les liaisons homophiliques de la E-cadhérine sont capable d'initier à elle seule une inhibition de la prolifération nommée inhibition de contact (Perrais, Chen, Perez-Moreno, & Gumbiner, 2007). La formation des JA induit l'activation de diverses voies de signalisation impliquant les MAPK (Betson, Lozano, Zhang, & Braga, 2002) *via* EGFR, le recrutement de PI3K et la phosphorylation d'AKT. Cela conduit à la résistance à l'apoptose, la croissance cellulaire ainsi que la migration et l'invasion (Manning & Cantley, 2007).

Récemment, des études ont mis en exergue le rôle des complexes d'adhérence cellule-cellule dans le destin des cellules souches et la reprogrammation de cellules somatiques (pour revue (Pieters & van Roy, 2014)).

Seules les JA matures peuvent induire la différenciation des cellules épithéliales (S. Gout et al., 2004). La maturation des JA est permise par le recrutement des cadhérines dans les radeaux lipidiques où elles s'associent à p120ctn. Les contacts intercellulaires induits par les cadhérines stimulent l'expression de l'apoprotéine A IV (apoA-IV) *via* l'accumulation du

facteur de transcription HNF-4α (*Hepatic Nuclear Factor 4α*). L'apoA-IV est un marqueur de différenciation entérocytaire tardif exprimé dans les villi. La E-cadhérine induit également dans les cellules Caco2 indifférenciées, la phosphatase alcaline et l'IFABP (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein*), deux marqueurs de différenciation cellulaire (Mariadason, Velcich, Wilson, Augenlicht, & Gibson, 2001). Des expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation mettent en exergue que la PI3K permet l'assemblage des JA qui à son tour contrôle p38/MAPK et la différenciation entérocytaire (Laprise et al., 2002; Peignon et al., 2006) avec l'expression de Cdx2, impliqué dans la régulation de gènes acteurs de la différenciation (Houde et al., 2001).

L'inhibition de la PI3K conduit à la perte:

i) des marqueurs de différenciation entérocytaire

ii) de l'expression de la sucrase-isomaltase

iii) de la villine

iv) de la formation d'une bordure en brosse (Laprise et al., 2002).

La polarité apico-basale des cellules est également un marqueur morphologique de la différenciation épithéliale. Les JA assurent en partie la mise en place et le maintien de la structure polarisée en régulant le cytosquelette d'actine par les GTPases. Le recrutement et l'activation de Rac1 et Cdc42 au niveau des JA permettent de réguler la polymérisation de l'actine et de former un anneau contractile d'actine qui renforce la cohésion des cellules.

viii. Régulation du désassemblage des jonctions adhérentes

La E-cadhérine membranaire a une demi-vie d'environ 5 heures (Shore & Nelson, 1991). L'internalisation de cette protéine est souvent altérée dans les cancers et le déséquilibre dans la balance recyclage/ dégradation conduit par exemple à la dégradation de la E-cadhérine et à la migration cellulaire.

L'endocytose implique de nombreux mécanismes (pour revue (de Beco, Amblard, & Coscoy, 2012; Platta & Stenmark, 2011; Sigismund et al., 2012). La E-cadhérine peut être internalisée par des processus dépendant ou indépendant des vésicules à clathrine ou à cavéoline (pour revue (Delva & Kowalczyk, 2009) qui permettent la régulation des contacts intercellulaires en recyclant le « pool » de E-cadhérine membranaires.

Différentes GTPases sont impliquées dans la régulation de cette endocytose : ARF6 est activé suite à l'internalisation de la cadhérine alors que Rac1 et Cdc42 protègent les cadhérines de l'internalisation en favorisant l'association avec le cytosquelette d'actine. L'activation de src

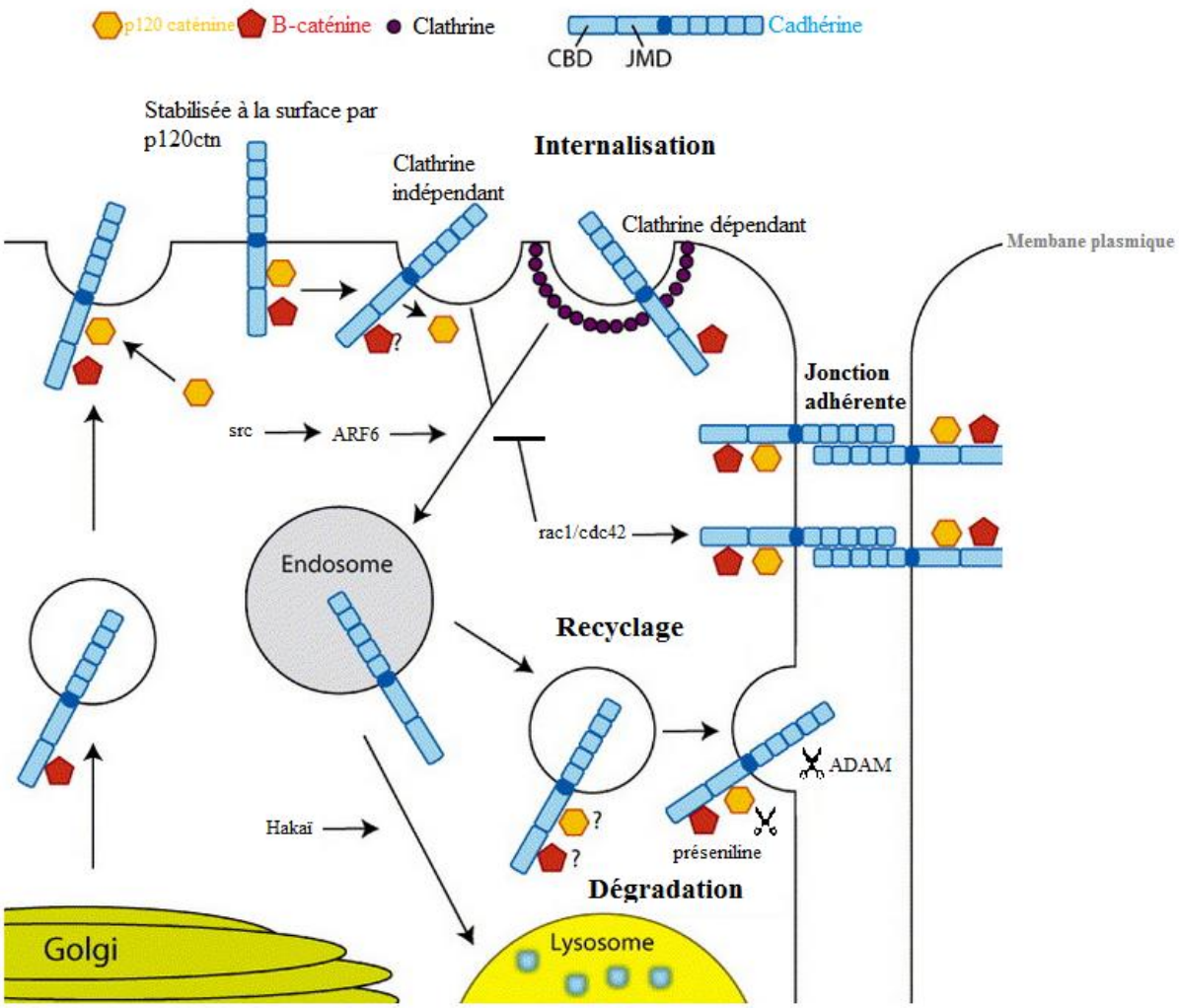


Figure 23. Régulation dynamique du taux de cadhérine membranaires: endocytose et recyclage.

A la membrane plasmique, la cadhérine est associée à p120ctn et à β-caténine par les domaines JMD et par CBD respectivement. Dans le cas de E-cadhérine, cette protéine est transportée à la membrane en association avec la β-caténine. A la membrane plasmique, p120ctn protège la cadhérine de l'endocytose en entrant en compétition avec Hakaï et avec la preseniline 1, responsable de la protéolyse du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine. L'internalisation de la cadhérine, particulièrement par la voie dépendante de la clathrine, requière la dissociation de p120ctn du JMD de la cadhérine. Suite à son endocytose, la cadhérine est transporté dans des endosomes précoces où elle peut être recyclée à la membrane ou conduit dans des endosomes tardifs ou des lysosomes pour être dégradée.
Différentes GTPases sont impliquées dans la régulation de cette endocytose : ARF6 est activé suite à l'internalisation de la cadhérine alors que Rac1 et Cdc42 protègent les cadhérines de l'internalisation en favorisant l'association avec le cytosquelette d'actine. L'activation de src induit la phosphorylation sur tyrosine de la E-cadhérine. Ce processus conduit à la mono-ubiquitination de la E-cadhérine par Hakaï provoquant son endocytose et sa dégradation .
D'après Crosnier, 2006.

induit la phosphorylation sur tyrosine de la E-cadhérine. Ce processus conduit à la mono-ubiquitination de la E-cadhérine par Hakaï provoquant son endocytose et sa dégradation (Y. Fujita et al., 2002). L'association avec p120ctn permet de protéger la E-cadhérine de son internalisation et sa dégradation en entrant en compétition avec Hakaï et avec la preseniline 1, responsable de la protéolyse du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine (figure 23) (Baki et al., 2001; Y. Fujita et al., 2002; Xiao, Oas, Chiasson, & Kowalczyk, 2007).

L'activation d'autre tyrosine kinases comme Fer, Fyn ou les récepteurs tyrosine kinases induisent la phosphorylation de la β-caténine. Ce mécanisme inhibe son interaction avec la E-cadhérine et avec l'α-caténine (Roura, Miravet, Piedra, García de Herreros, & Duñach, 1999) déstabilisant ainsi les jonctions adhérentes et favorisant la migration cellulaire (André et al., 1999). Par ailleurs, le domaine de la E-cadhérine qui se lie à la β-caténine contient une séquence PEST impliquée dans l'adressage au protéasome.

La perte d'interaction entre les deux protéines pourrait donc faciliter la dégradation de la E-cadhérine (Lilien, Balsamo, Arregui, & Xu, 2002). L'expression des protéines ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) inhibe également l'adhérence intercellulaire dépendante des cadhérines. Ces protéases peuvent diviser la E-cadhérine en deux fragments : un fragment C-terminal intracellulaire (CTF) de 38 kDa et un fragment extracellulaire soluble de 80 kDa (NTF pour fragment N-terminal) (Maretzky 2005). CTF peut s'associer avec p120ctn ou β-caténine puis est relocalisé dans le noyau où il induit la transcription de gènes impliqué dans la migration et la prolifération cellulaire tels que la cycline D1, c-myc et c-jun (figure 24). Actuellement, il n'est pas déterminé si CTF seul est suffisant pour induire ces mécanismes ou s'il doit être en association avec β-caténine ou p120ctn (McCusker & Alfandari, 2009).

Tandis que le fragment extracellulaire s'associe avec les récepteurs à l'ErbB, Her2 et Her3 induisant la prolifération et la migration cellulaire (H. Chen, Paradies, Fedor-Chaiken, & Brackenbury, 1997; Cifuentes-Diaz, Nicolet, Goudou, Rieger, & Mege, 1994; Utton, Eickholt, Howell, Wallis, & Doherty, 2001).

Par ailleurs dans le sérum, le dosage du fragment soluble de la E-cadhérine est utilisé comme marqueur précoce pour prédire la récidive les cancers gastriques (Chan et al., 2005). Ainsi les protéines ADAM 9,10 et 15 sont décrites pour inhiber l'adhérence intercellulaire et favoriser la migration cellulaire (Hirao 2006).

Les différents acteurs de l'endocytose de la E-cadhérine sont plus précisément décrits dans la revue : « Dynamic regulation of adherens junctions: implication in cell differentiation and tumor development » que vous trouverez en annexe.

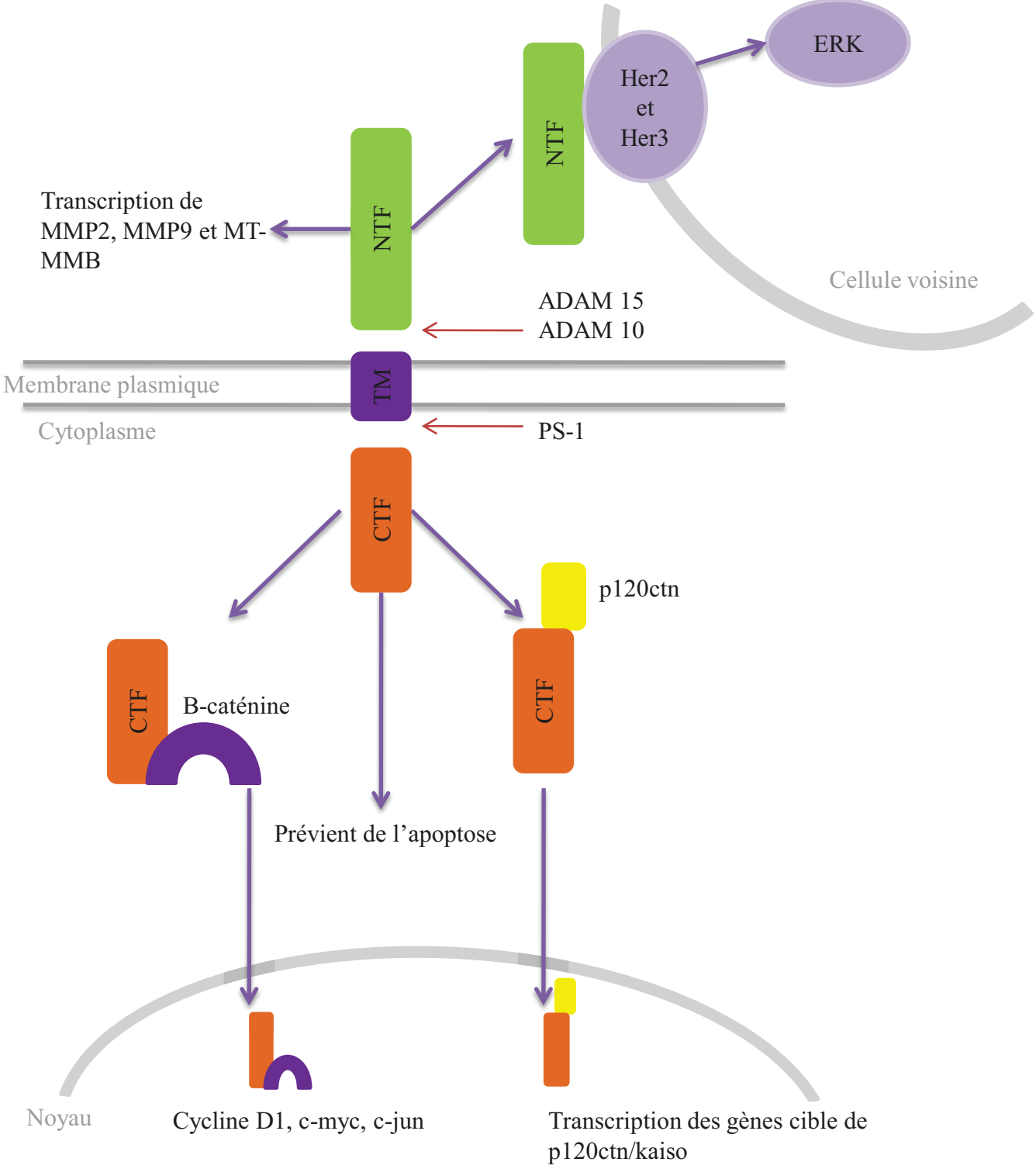


Figure 24. L'activité biologique des fragments de la E-cadhérine.

Les fragments de la E-cadhérine: CTF (fragment C-terminal intracellulaire) et NTF (fragment N-terminal extracellulaire) interagissent avec les récepteurs à l'EGF, la β-caténine et p120ctn. Ces fragments protègent les cellules de l'apoptose, induisent la migration cellulaire et la transcription de nombreux gènes cibles.

2) Jonction cellule-matrice extracellulaire

Les cellules épithéliales adhérent à une matrice extracellulaire (MEC) spécialisée appelée lama basale *via* des complexes protéiques : les hémidesmosomes et les adhérences focales localisées à leur pôle basal. Ces complexes sont constitués de protéines transmembranaires de la famille des intégrines liées à des protéines intracellulaires structurales et régulatrices.
Ce système d'adhérence à la capacité de :
i) moduler la signalisation intercellulaire en fonction de l'environnement
ii) varier sa composition et sa force d'engagement durant la différenciation des cellules épithéliales démontrant que ces complexes d'adhérence sont importants dans le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal (Beaulieu, 1999; Carroll, Wong, Drabik, & Chang, 1988; Kedinger, Lefebvre, Duluc, Freund, & Simon-Assmann, 1998; Stutzmann, Bellissent-Waydelich, Fontao, Launay, & Simon-Assmann, 2000).

Dans cette partie, les différents acteurs dans l'adhérence cellule-MEC et leur lien avec les protéines des JA seront présentés.

a) La lame basale : une forme particulière de la MEC.

La lame basale constitue la frontière entre les cellules épithéliales et le tissu conjonctif. Sa composition riche en peptidoglycanes lui confère une consistance de gel hydrophylique qui permet de retenir les molécules de signalisation circulantes telles que les facteurs de croissance et les neuromédiateurs. Elle est composée de macromolécules synthétisées par l'épithélium et le chorion. On y retrouve différentes formes de collagènes, de laminines, de fibronectines et de protéoglycanes associés selon un réseau structuré (Aumailley & Krieg, 1996; Simon-Assmann, Kedinger, De Arcangelis, Rousseau, & Simo, 1995).

b) Les différents constituants de la lame basale

Le principal constituant de la lame basale est le collagène de type IV, qui constitue un support pour les autres macromolécules et interagit avec les cellules épithéliales *via* les intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ (P. Gout, Jacquier-sarlin, Rouard-talbot, Rousselle, & Block, 2001; Vandenberg et al., 1991). Le collagène de type VII est uniquement observé dans le petit intestin de l'adulte (Leivo et al., 1996; Lohi et al., 1996).

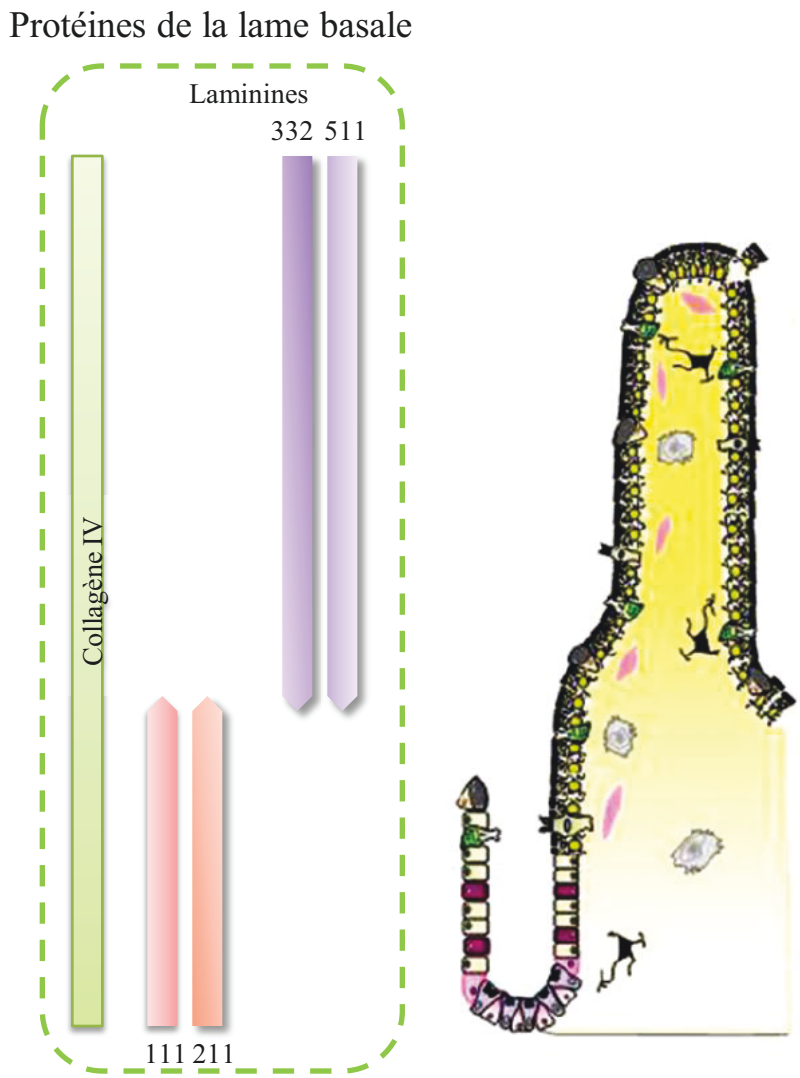


Figure 25. Distribution des laminines le long de l'axe crypto-villositaire: importance dans la morphogénèse intesintale et la différenciation cellulaire.

Les protéines de la MEC sont distribuées de façon différentielle le long de l'axe crypto-villositaire d'un intestin grêle adulte. Les laminines 111 et 211 sont restreintes aux cryptes alors que les laminines 332 et 511 sont exprimées au niveau des villosités. Le collagène IV est exprimé uniformément le long de l'axe crypte-villus.
Les protéines de la lame basale jouent un rôle majeur dans l'organogénèse et le développement embryonnaire. Elles sont capables de réguler différents processus tels que la prolifération, la polarité, la différenciation et la migration.

i. Les laminines

Les laminines sont des glycoprotéines hétéro-trimériques composées de sous-unités α, β et γ (3α, 5β et 3γ). Leur assemblage est stabilisé par des ponts disulfures.
A ce jour, 19 isoformes de laminines sont répertoriées (Durbeej, 2010) dont 4 sont exprimées dans l'épithélium intestinal : la laminine 111, 211, 332 et 511 (Teller & Beaulieu, 2004; Turck et al., 2005).
Des expériences d'immunohistochimie mettent en évidence que la répartition des composés de la lame basale le long de l'axe crypto-villositaire n'est pas homogène (figure 25). Il est aussi décrit que les isoformes des laminines évoluent lors de l'embryogénèse (Simo et al., 1991; Simon-Assmann et al., 1995) et on observe des variations spatiales de ces isoformes dans les cryptes et les villi chez l'adulte. Les laminines 111 et 211 sont essentiellement situées dans les cryptes alors que les laminines 332 et 511 sont localisées dans les villi (Basora et al., 1999). De plus, la laminine 332 forme un gradient sur l'axe crypto-villotaire corrélant avec la différenciation des entérocytes. La répartition spécifique des composants de la MEC suggère que celle-ci selon sa composition peut activer certaines voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Turck et al., 2005).

ii. Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéinees impliquées dans l'ancrage et la migration des cellules sur la MEC, la stabilisation du cytosquelette, la mise en place d'une signalisation bidirectionnelle, la formation d'hémidesmosomes ou encore le diapédèse lymphocytaire (Barczyk, Carracedo, & Gullberg, 2010).
Chaque intégrine est composée de deux sous-unités (α et β) parmi 24 α et 9 β. Les couples αβ ont une affinité variable suivant les ligands et une spécificité dépendante de leur sous-unité α. Ainsi, certaines isoformes sont impliquées dans la reconnaissance des collagènes (les intégrines α_1, α_2, α_{10}, α_{11}), des laminines (les intégrines α_3, α_6, α_7) ou les motifs RGD (les intégrines α_5, α_8, αV). β1 est la sous-unité la plus représentée (en terme de nombre de sous-unité et de répartition dans les tissus) et reconnait différentes protéines de la MEC telles que la fibronectine, la vitronectine, les collagènes et les laminines.
Les intégrines présentent à la surface des cellules ne sont pas constitutivement actives. L'activation des intégrines est couplée à un changement de conformation qui peut être induit par le recrutement de protéines cytoplasmiques.

Les complexes cellules-MEC

Dans l'éptihélium, on distingue deux types de complexes d'adhérence selon les intégrines impliquées :

i) les adhérences focales (AF) formées à partir d'hétérodimères (une sous-unité β_1 et β_3). Ce sont de véritables plateformes de signalisation qui peuvent recruter des protéines structurales (souvent associées au cytosquelette d'actine, elles sont responsables de l'architecture des AF) et des protéines adaptatrices qui peuvent participer au recrutement des protéines de signalisation comme la *Focal Adhesion Kinase* (FAK), des *Integrin linked kinase* (ILK), des protéines G monomériques ou des phosphatases (Schaller, Otey, Hildebrand, & Parsons, 1995).

ii) les hémidesmosomes (HD) formés à partir d'hétérodimère (une sous-unité α et β). $\alpha_6\beta_4$ est un hétérodimère unique puisqu'il possède un domaine cytoplasmique beaucoup plus long que les autres sous-unités β. L'importance de la sous-unité β4 dans la cohésion de l'épithélium a été mise en évidence chez des souris dont la sous-unité β4 est génétiquement supprimée. Cette délétion induit une perte des hémidesmosomes, des défauts d'adhérence et de la prolifération cellulaire (Murgia et al., 1998). Au niveau de l'intestin, on trouve uniquement des HD de type II dans lesquels $\alpha_6\beta_4$ interagit avec HD1/ plectin (Fontao, Stutzmann, Gendry, & Launay, 1999). Cet épithélium étant dépourvu des protéines BP180 et BP230 constituant les HD de type I (Orian-Rousseau et al., 1998). Les HD intestinaux sont actifs qu'au niveau des villi. Les travaux de Beaulieu révèlent la présence dans l'intestin d'un variant de β_4 dépourvu de son extrémité C-term, nommée β_4Actd (Basora et al., 1999). β_4Actd peut s'associer avec α_6 mais son interaction avec la laminine 332 est impossible. Cette forme tronquée s'exprime préférentiellement dans les cryptes alors que $\alpha_6\beta_4$ est exprimée dans les villi où les cellules sont différenciées, en adéquation avec le profil d'expression de la laminine 332. Les intégrines peuvent également former des complexes

Rôle des intégrines dans l'intestin

Le répertoire d'intégrines exprimé le long de l'axe crypto-villositaire varie en adéquation avec les molécules de la MEC suggérant une régulation réciproque entre les deux partenaires qui va contrôler les processus de prolifération, de migration et de différenciation des IEC.

La prolifération

La délétion conditionnelle de β1 dans l'intestin de souris ne modifie pas les capacités d'adhérence de la MEC mais par contre induit une hyper-prolifération due à la dérégulation de la voie Hedgehog (R. G. Jones et al., 2006). Dans les cellules de carcinomes coliques humains, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction entre $\alpha_5\beta_1$ et la fibronectine induit une augmentation des cyclines A et E et de la kinase Cdx2 (Gong, Ko, & Brattain, 1998). La plupart du temps, les intégrines régulent la prolifération cellulaire en interagissant avec la signalisation dépendante de facteurs de croissance aboutissant à l'activation de ERK (Schwartz & Assoian, 2001). Une autre voie de signalisation implique PI3K et ILK qui inactivent GSK-3 conduisant à la transcription de la cycline D1 *via* le complexe β-caténine/TCF. Les intégrines peuvent contrôler la prolifération cellulaire en maitrisant la dégradation des inhibiteurs des cyclines p21 et p27 (Roovers & Assoian, 2000). La surexpression de β_4 dans les carcinomes coliques RKO induit une augmentation de p21 et une diminution de la prolifération cellulaire (Clarke, Lotz, Chao, & Mercurio, 1995).

La différenciation cellulaire

Une régulation fine dans les interactions MEC-cellule lors de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales suggèrent une relation étroite entre la signalisation des intégrines et le processus de différenciation impliquant les protéines des JA telles que la E-cadhérine et les caténines.

Le rôle des intégrines dans ce processus a été mis en évidence par les expériences d'inhibition de l'interaction entre la MEC et les intégrines. Si on bloque la LN111, on empêche l'expression de lactase dans les IEC (Simo, Simon-Assmann, Arnold, & Kedinger, 1992). De même la culture de Caco-2 sur des MEC enrichies en LN332 ou en CoIV induit une augmentation de l'expression d'Apo-IV (Peignon et al., 2006). Les travaux de Basora ont également permis d'associer l'expression de l'intégrine $\alpha_{7b}\beta_1$ à la différenciation des cellules intestinales. En effet, cette intégrine est préférentiellement exprimée au niveau des villi et que son expression corrèle avec celle de la sucrase-isomaltase (SI) (Basora et al., 1999)L'isoforme 111 induit l'expression de la SI puis l'activation de la voie p38/MAPK (Turck et al., 2006) ce qui conduit à la différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001).

De plus, les intégrines à sous-unité α_6 sont également impliquées dans la différenciation puisque son blocage inhibe l'apparition des marqueurs de différenciation entérocytaire dans les cellules Caco-2 (Basson, Emenaker, & Sanders, 2000).

3) Cross-talk entre les différents systèmes d'adhérence

Les composants de la MEC peuvent interagir avec les jonctions intercellulaires en modifiant la stabilité de ces dernières ou en régulant la différenciation entérocytaire.

Les étapes de prolifération et de différenciation des IEC sont tégulés par des voies de signalisation communes aux jonctions cellule-cellule et cellule-MEC. De plus, les changements de composition de la MEC le long de l'axe crypto-villositaire suggère une régulation croisée entre les deux systèmes.

Le niveau d'expression des protéines des JA et leur assemblage peut être régulés par des intégrines. L'activation d'ILK associée aux intégrines β_1 et β_3 au sein des AF, régule négativement les jonctions intercellulaires en favorisant l'activité transcriptionnelle du complexe β-caténine/TCF (Oloumi, McPhee, & Dedhar, 2004). De même la surexpression d'ILK dans les IEC de rat induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine. Ces effets sont dépendants de la localisation d'ILK. En présence de Ca^{2+}, ILK se délocalise vers les contacts intercellulaires où elle pourrait participer à la mise en place des JA (Vespa, D'Souza, & Dagnino, 2005).

Dans les cellules du cancer du côlon, l'intégrine β_1 induit l'activation de la FAK ce qui conduit à la stimulation de src et l'endocytose de la E-cadhérine (Avizienyte et al., 2002). Ce processus semble dépendre de la phosphorylation de la myosine par Src (Avizienyte, Fincham, Brunton, & Frame, 2004; Martinez-Rico, Pincet, Thiery, & Dufour, 2010). Cependant, la voie de signalisation activée n'est pas intégralement élucidée et semble dépendre du type cellulaire et du tissu étudié.

Ainsi, une autre étude indique que l'activation de FAK par TGF-β induit l'expression de la E-cadhérine dans les cellules du carcinome du côlon (Hongmei Wang, Radjendirane, Wary, & Chakrabarty, 2004). Cependant dans cette dernière étude la localisation de la E-cadhérine n'est pas analysée : la E-cadhérine pourrait être piegée dans des vésicules cytoplasmiques et l'adhérence intercellulaire ne serait pas augmentée.

Plus récemment, il a été mis en évidence que l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ peut induire la translocation de la β-caténine dans le noyau (Y. Kim et al., 2009). En effet, les expériences d'immunofluorescence démontrent que l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ s'associe physiquement avec la E-cadhérine et le récepteur TGF-β. Ce complexe multiprotéique (l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, le récepteur au TGF-β, la E-cadhérine) résulte de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la □-caténine qui peut alors interagir avec pSmad2 (acteur de la voie de signalisation de TGF-□). La β-caténine est alors dirigée dans le noyau où elle peut réguler la transcription.

Dans les kératinocytes et les cellules du cancer du côlon, la laminine 332 *via* Cdc42 et Rac1b permet de stabiliser les JA (Chartier et al., 2006; Hintermann, Yang, O'Sullivan, Higgins, & Quaranta, 2005). Tandis que dans les cellules de carcinome IGF se fixe à IGF-R ce qui induit la dissociation des jonctions intercellulaires et favorise la relocalisation de l'intégrine αV aux contacts focaux stimulant la migration (Canonici et al., 2008).

4) L'adhérence dans un contexte pathologique

La perturbation des JA et des JS ainsi que le remodelage de la MEC est observé dans des situations pathologiques comme lors de l'inflammation ou le cancer.

a) L'expression des protéines des JA

i. Dans le cadre des MICI

Chez les patients atteints MICI, l'adhérence intercellulaire est altérée. On note ainsi la diminution de l'expression de la E-cadhérine, de l'α-caténine, et de la p120ctn (Karayiannakis et al., 1998) ainsi que l'existence d'une forme de E-cadhérine tronquée ne permettant pas la formation de JA fonctionnelles (Muise et al., 2009).
Cette modification d'expression semble une conséquence de l'inflammation et non une cause de celle-ci puisque l'expression et la localisation des cadhérines sont conservées dans les tissus non inflammés des patients (Gassler et al., 2001). La perte des cadhérines provoque donc également une perte des contacts intercellulaires ne permettant plus à l'éptihélium de jouer son rôle de barrière. Le rôle des cadhérines dans la suppression et l'initiation ou la progression de cancers a été discutée dans une excellente revue de Frans Van Roy (Frans van Roy, 2014).

ii. Dans le cadre du développement tumoral

La perte des contacts intercellulaires et la diminution de l'expression de la E-cadhérine est un marqueur de la progression cancéreuse et tumorale (M Takeichi, 1995; Frans van Roy, 2014). Le gène codant pour cette cadhérine, CDH-1 est muté dans différents cancers gastriques (Machado et al., 1999). Cependant ces mutations sont plus rares dans le cancer du côlon.

Lors de la cancérogenèse, on note une changement de la E-cadhérine par des cadhérines mésenchymateuses telles que la N-cadhérine ou la cadhérine 11 augmentant ainsi le pouvoir invasif des cellules (Hazan, Phillips, Qiao, Norton, & Aaronson, 2000; Suyama, Shapiro, Guttman, & Hazan, 2002). Le passage de la E-cadhérine à la P-cadhérine se traduit également par la translocation de la p120ctn dans le cytoplasme. Ce phénomène induit la migration cellulaire par l'activation de Rac1 et Cdc42 (Cheung, Leung, & Wong, 2010).

La E-cadhérine est considérée comme un gène suppresseur de tumeur qui maintient l'intégrité de l'épithélium et inhibe la migration et l'invasion (Nelson & Nusse, 2004). Dans les cancers sporadiques, la diminution de l'expression de la E-cadhérine est associée à la dédifférenciation et à la formation de métastases alors que son expression membranaire confère un meilleur pronostic (Dorudi, Sheffield, Poulsom, Northover, & Hart, 1993; Elzagheid et al., 2006).
De nombreux mécanismes de répression de la E-cadhérine sont observés dans le CCR. Il est par exemple mis en évidence une l'augmentation de Snail et Slug, deux répresseurs transcriptionnel de la E-cadhérine, dans respectivement 78% et 37% des échantillons issus de tumeurs (H. K. Roy, Smyrk, Koetsier, Victor, & Wali, 2005; Shioiri et al., 2006).
Par ailleurs, la réduction de l'expression de la E-cadhérine impacte le taux et la localisation des caténines ce qui accélèrent le tumorogenèse.

Dans l'épithélium différencié et sain, la β-caténine et la p120ctn ont un rôle dans les JA par la stabilisation de la E-cadhérine. Lors de la perte des JA, les caténines activent la prolifération cellulaire et la migration. Ces mécanismes sont efficaces pour maintenir l'homéostasie par le renouvellement cellulaire rapide de l'épithélium intestinal. Cependant cela représente un talon d'Achille dans la tumorogenèse. La signalisation des caténines est affectée dans de nombreux cancers (pour revue (Schackmann, Tenhagen, van de Ven, & Derksen, 2013)).
L'accumulation de la β-caténine est observée dans 20 à 90% des cancers gastro-intestinaux (Ogasawara et al., 2006) et la délocalisation de p120ctn dans plus de 50% des cancers colorectaux (Bellovin, Bates, Muzikansky, Rimm, & Mercurio, 2005) (pour revue (Pieters, van Hengel, & van Roy, 2012)). L'expression de p120ctn est réduite dans les cancers gastro-œsophagiens (Stairs et al., 2011). Les gènes des caténines subissent également des mutations: dans 20 à 25% des cas, la β-caténine est mutée et induit l'expression de gènes pro-oncogéniques (Iwao et al., 1998; Mirabelli-Primdahl et al., 1999). Le cas de p120ctn est ambivalent puisque cette caténine possède soit des propriétés pro-oncogéniques soit des

caractéristiques suppressive de tumeur. En effet, cela dépend de l'isoforme de p120ctn et du tissu étudié (pour revue (Kourtidis, Ngok, & Anastasiadis, 2013)).

b) L'adhérence MEC-cellule

Le gradient de laminines est modifié dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Lors des poussées inflammatoires ; la libération du TNFα (*Tumor Necrosis Factor*) et de l'interféron gamma induisent la sécrétion des laminines 332 et 511 au niveau des cellules épithéliales de la crypte (habituellement exprimées au nivea udes villi) alors qu'elles ne produisent pas de laminine 211 (laminine sécrété habituellement au niveau des cryptes). La déposition de ces substrats d'adhérence participe aux phénomènes de prolifération, de migration et d'invasion tumorale. En effet, lors de la progression tumorale, les cellules subissent une dé-différenciation. L'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses est induite par l'altération de l'expression des intégrines vers un proche semblable a celui des cryptes. On note par exemple une surexpression de l'intégrine αVβ3 qui favorise la tumorogenèse en i) régulant l'expression de MMP2 qui dégrade la MEC (Guo & Giancotti, 2004); ii) interagissant avec le récepteur VEGF (*Vascular Endothélial Growth Factor*), un facteur de croissance impliqué dans l'angiogenèse (mécanisme indispensable au développement tumoral) (L. E. Reynolds et al., 2002; Somanath, Malinin, & Byzova, 2009). Dans les CCR, les sous-unités α2 et α5 des intégrines sont également augmentées : elles sont impliquées dans la prolifération et l'acquisition d'un caractère métastatique. On note une diminution de l'anoïkose par la perte de l'expression de la sous-unité α8.

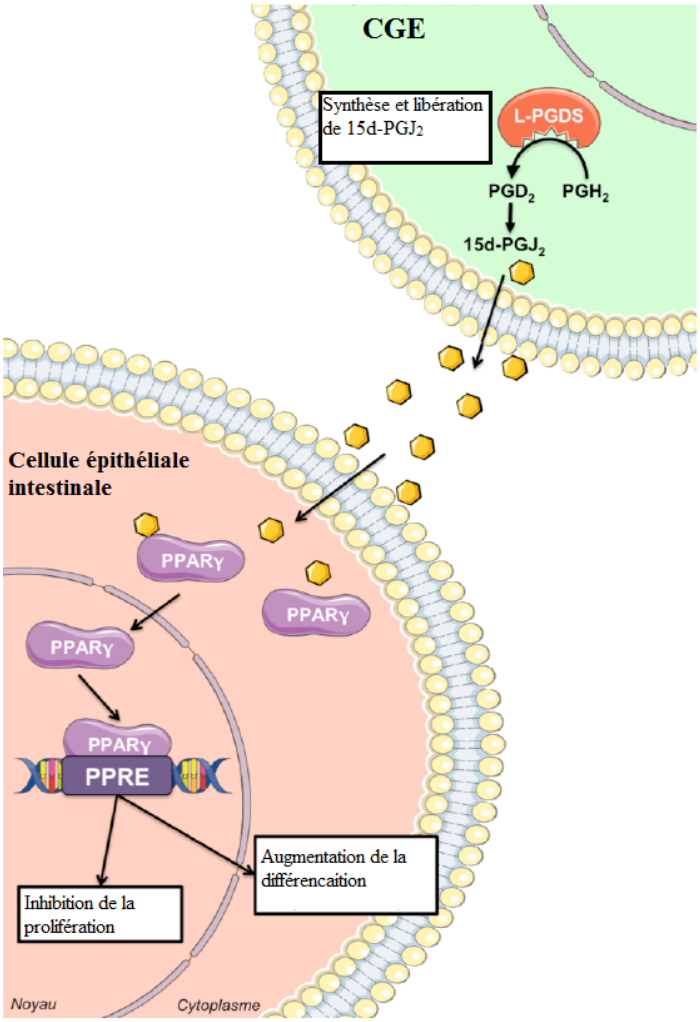


Figure 26. Rôle protecteur des cellules gliales entériques sur la barrière épithéliale intestinale.

Les cellules gliales entériques (CGE) possèdent l'appareil enzymatique nécessaire à la production de la 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostagmandine J_2 (15d-PGJ_2), un dérivé d'acides gras oméga-6 polyinsaturés qui est l'un des plus importants agonistes naturels de PPARγ. La 15d-PGJ_2 active PPARγ et induit sa translocation dans le noyau où il induit la transcription de gènes cibles tels que la E-cadhérine et la phosphatase alcaline. Cela induit l'augmentation de la différenciation et l'inhibition de la prolifération.
D'après la thèse de Maxime Mahé, janvier 2012.

V. Rôle du système nerveux dans le contrôle de la barrière

Le SNE joue un rôle dans le contrôle de la barrière épithéliale. Il a été montré que les voies VIPergiques issues du plexus sous-muqueux induient une de la perméabilité paracellulaire permettant le passage sélectif de molécules grâce aux JS, associée à l'augmentation de la protéine ZO-1 (Michel Neunlist et al., 2003).

Les CGE soutiendraient la fonction de barrière épithéliale promue par le plexus sous-muqueux. En effet, la déplétion en CGE dans un modèle murin conduit à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Bush et al., 1998). *In vitro,* dans une modèle de co-culture de cellules épithéliales (Caco-2) et de CGE, il a été émis en évidence que les CGE inhibent la prolifération cellulaire par la libération de TGF-β1 et augmentent la résistance transépithéliale (Neunlist et al., 2007).

Les CGE favorisent également la réparation de la barrière épithéliale en augmentant l'étalement des cellules épithéliales en produisant du pro-EGF, le précurseur de l'EGF (Van Landeghem et al., 2011).

Par ailleurs, une étude portant sur le transcriptome des IEC après co-culture avec des CGE a permis de mettre en évidence que les CGE sont aptes à modifier l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'adhérence, l'apoptose mais aussi la motilité cellulaire (Van Landeghem et al., 2009). Ainsi, il a été montré que le gène PPARγ qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des IEC, voit son expression augmentée lorsque les IEC sont cultivées avec des CGE (Kitamura et al., 1999) (figure 26). Les CGE possèdent l'équipement enzymatique (dont la prostaglandine D synthase lipocaline, L-PDGS) nécessaire à la production de la 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostagmandine J_2 (15d-PGJ_2), un dérivé d'acides gras oméga-6 polyinsaturés qui est l'un des plus importants agonistes naturels de PPARγ (Bach-Ngohou et al., 2010; Scher & Pillinger, 2005). L'utilisation de lignées de CGE invalidées génétiquement pour la L-PGDS ou par l'utilisation d'antagoniste de PPARγ (le GW9662), a permis de mettre en évidence que l'effet anti-prolifératif des CGE est lié à la production de 15d-PGJ_2 et à l'activation de PPARγ (Bach-Ngohou et al., 2010). Par ailleurs, les GCE *via* PPARγ peuvent aussi moduler la différenciation cellulaire en augmentant l'expression des gènes cibles codant pour de la E-cadhérine et la phosphatase alcaline (Bach-Ngohou et al., 2010).

Chapitre II. Les pathologies digestives

Synopsis :
Maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH)
Inflammation
Risque accru de cancer colorectal
Etiopathologie multifactorielle dont la génétique, l'environnement

I. Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin

Les MICI se composent de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH).
En Europe, le nombre de patient atteints de MICI est estimé à 850 000 pour la RCH dont 60 000 en France, et 1 000 000 pour la MC dont 40 000 en France. Les MICI touchent plus volontiers les sujets jeunes, entre 20 et 30 ans pour la MC, 30 à 40 ans pour la RCH, mais l'on note également un pic d'incidence également entre 50 et 60 ans. On observe également que la MC prédomine chez les femmes.

Les MICI se manifestent par des poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémission. Le déclenchement, la durée et la sévérité des crises peuvent varier suivant les patients et au cours de la pathologie. Les symptômes les plus souvent associés aux MICI sont des douleurs abdominales, des diarrhées, un amaigrissement et un ralentissement de l'état général (fatigue excessive, fièvre). Dans 20% des cas, les patients développent également des manifestations inflammatoires extra-digestives telles que des atteintes articulaires (polyarthrites), dermatologiques (ulcération, érythème noueux) et oculaires (conjonctivites) (Larsen, Bendtzen, & Nielsen, 2010).

La MC et la RCH ne présentent pas les mêmes atteintes physiologiques. En effet, la MC est caractérisée par une inflammation pouvant toucher l'ensemble de tube digestif (de la bouche à l'anus) avec des manifestations généralisées ou ciblées. Ces lésions sont dites transmurales puisqu'elles atteignent les différentes couches de la paroi digestive et peuvent

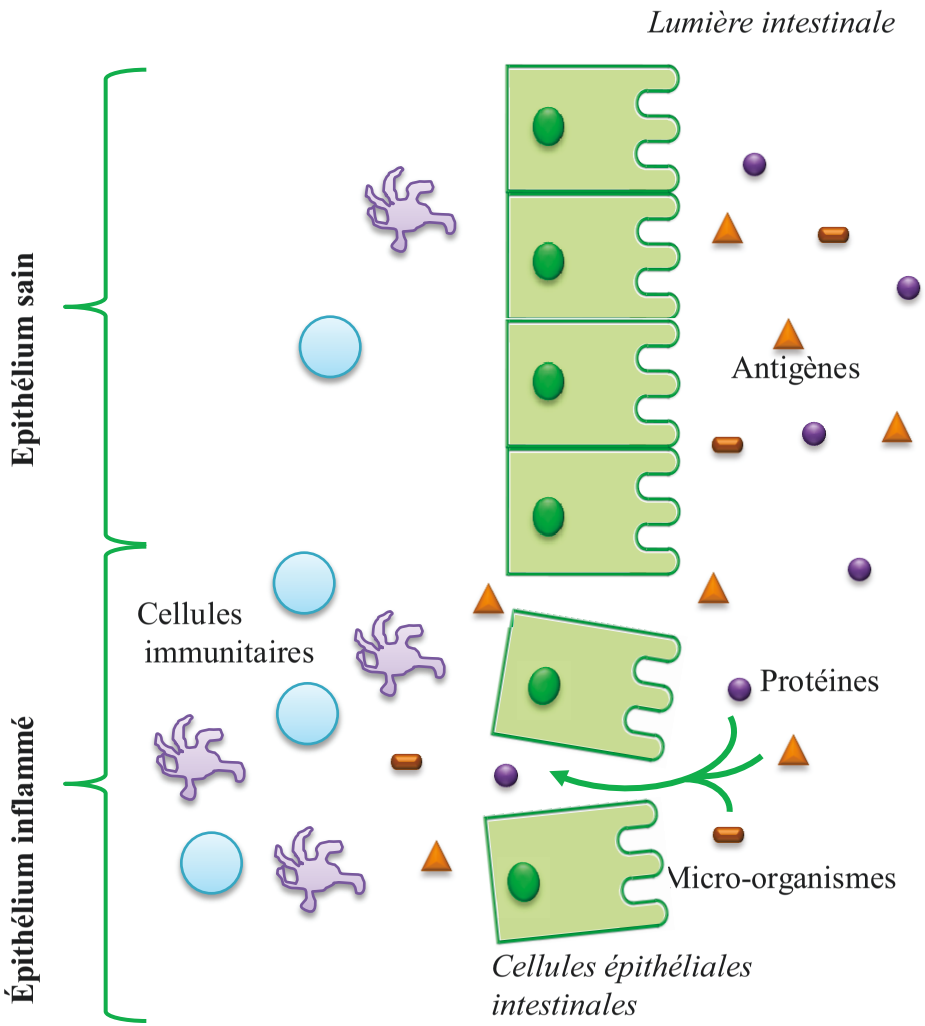


Figure 27. MICI et altération de la barrière épithéliale.

Les MICI s'illustrent par une rupture de la barrière épithéliale. L'augmentation de la perméabilité intestinale conduit à l'activation des cellules immunitaires sous-jacentes par des antigènes (protéines, micro-organismes…). La stimulation du système immunitaire amène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire.

être responsables de perforations, de fistules et d'abcès. A l'inverse, la RCH provoque des lésions superficielles localisées au niveau du côlon et du rectum. Ces lésions ne touchent que la muqueuse et la sous-muqueuse. De plus, on note une altération de la barrière épithéliale intestinale caractérisée par une diminution de la sécrétion de mucus et de défensines et/ou une augmentation de la perméabilité transcellulaire ou paracellulaire (figure 27). Ce phénomène conduit à l'activation des cellules immunitaires de la *lamina propria*. Parallèlement à la dissociation des cellules épithéliales, on note une diminution de la tolérance immunitaire face aux molécules du soi (bactéries commensales) qui induit également une réponse immunitaire démesurée et non régulée (Fiocchi, 1998; Sartor, 2006) (figure 28).

1) L'inflammation

L'intestin est un tissu unique où l'équilibre est maintenu entre la réponse immune et la tolérance envers divers facteurs environnementaux incluant la flore intestinale et les antigènes issu du bol alimentaire. La réponse inflammatoire est un processus physiologique qui permet à l'organisme de mobiliser ses défenses pour faire face à une agression. Les éléments déclencheurs de l'inflammation peuvent être de natures différentes : chimique (détergents, solvant...), physique (ulcération, blessures...), ou infectieuse (bactérie, virus, parasites, champignons...).

a) La régulation des cellules immunitaires

L'inflammation se déroule suivant différentes phases qui font intervenir le recrutement et l'activation de populations leucocytaires spécifiques ainsi que la production et la libération de cytokines. L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est capable de répondre rapidement (quelques minutes à quelques heures) à l'agression de manière non-spécifique. L'immunité innée cimpliqent de nombreux types cellulaires comme les cellules épithéliales, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les natural killers (NK). Elle est initiée par la reconnaissance d'antigènes microbiens. Cela est permis par des récepteurs de reconnaissance comme les TLR sur la membrane des cellules et des récepteurs NOD/CARD15 dans le cytoplasme (Murillo, Morré, & Peña, 2003). Ces récepteurs sont activés par des motifs moléculaires PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) comme les LPS qui amènent à l'activation de NFkB. Ce dernier est impliqué dans la régulation de l'expression des cytokines comme TNFα, IL1 ou IL8

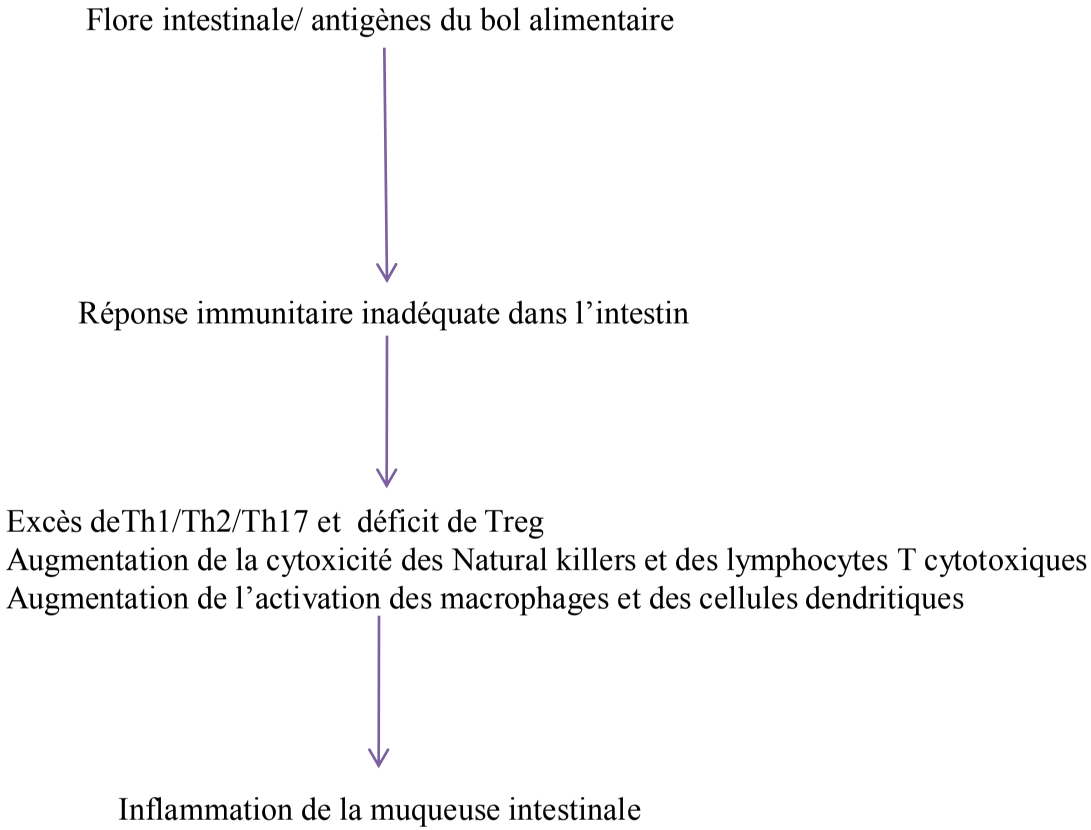


Figure 28. Pathogenèse d'une MICI.

Les MICI sont dues à un déséquilibre de la balance activation/ inhibition de la réponse immunitaire. Il est observé une l'hyperactivation des cellules Th1/Th17 pour la MC et Th2 pour la RCH, ainsi que des macrophages, des cellules dendritiques et des natural killers. Les T_{reg} permettent de réguler l'environnement cytokinique par la libération de molécules anti-inflammatoires comme IL-10 et TGFβ. Cependant, dans le cas des MICI, cette inhibition de la réponse immunitaire est inefficace. Ce déséquilibre conduit à l'inflammation de la muqueuse intestinale.

(Zheng, Meng, Zhao, Singh, & Song, 2008; Zuckerman, Evans, & Guthrie, 1991). L'ensemble de ces procédés permet la destruction de l'agresseur et de présenter les antigènes qui le composent aux lymphocytes pour déclencher la réponse adaptative.

Cette immunité hautement spécifique, est dépendante de l'activité des lymphocytes et des NK. Elle organise une réponse à médiation humorale par les lymphocytes B (LB) et cellulaire *via* les lymphocytes T helper (Th). Les LT se répartissent en sous-populations responsables de la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoire ou anti-inflammatoires qui régulent l'intensité de l'inflammation. Les cellules T naïves (Th0) après activation sont capables de se différencier en Th1, Th2 ou Th17. Une réponse immunitaire du type Th1/Th17 induit la synthèse de TNFα, INFγ, IL12, IL-21, et Th2 conduit à la production de IL-4, IL-13, IL-21 responsable de LT effecteur (Leung et al., 2010; X.-R. Xu, Liu, Feng, & Liu, 2014). Le nombre et l'activité des cellules T effectrices sont finement régulés par les T_{reg} ($Foxp3^{+}$). Ces derniers ont la capacité de supprimer la réponse inflammatoire *via* la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF-β et l'inhibition des mécanismes de présentation des antigènes. Le facteur de transcription Foxp3 a été identifié comme le régulateur principal des T_{reg} (Kayama, Nishimura, & Takeda, 2013). Les populations de cellules immunitaires activées et le profil cytokinique associé sont différents entre la MC et la RCH : il a été montré un excès Th1/Th17 pour la MC et Th2 dans la RCH (Sanchez-Munoz, Dominguez-Lopez, & Yamamoto-Furusho, 2008). De plus, le déficit des T_{reg} ne permet pas de réguler l'inflammation (figure 29).

b) Les modifications de l'épithélium

Dans la MC, il est observé une hypertrophie des cellules de gobelet avec une augmentation de la sécrétion du mucus et une diminution de l'activité anti-microbienne.

La RCH est quant à elle, caractérisée par une diminution de l'expression de MUC2 (gènes codant pour les mucines) et par la baisse de la densité des cellules à mucus amenant à une diminution de l'épaisseur du manteau de protection permis par le mucus (Strugala, Dettmar, & Pearson, 2008).

En outre, ces altérations conduisent à une diminution de la capacité du mucus à limiter le trafic des antigènes et la translocation des bactéries vers la *lamina propria*. Cependant, il n'a toujours pas élucidé si ces modifications de la barrière épithéliale sont une cause primaire de l'inflammation ou une conséquence de cette dernière.

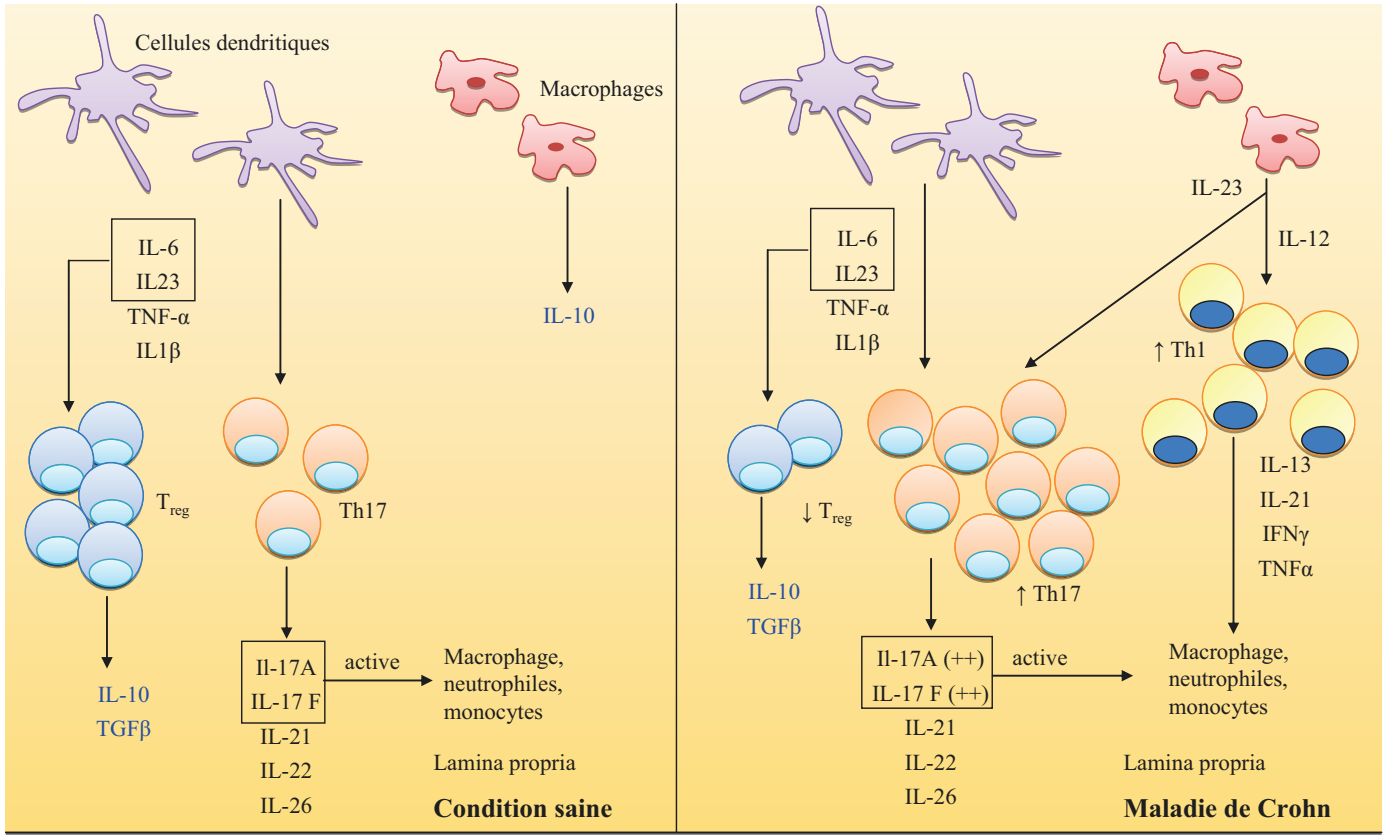


Figure 29. Déséquilibre de la balance Treg/Th1/Th17 dans la MC.

Il est observé une augmentation des Th1 et Th17 dans la *lamina propria* des patients MC. Les cellules Th1 sont induites par l'IL-12 et l'IL-23 (sécrétées par les macrophages) et produisent de IL-13, IL-21, IFNγ et TNFα. Les cellules dendritiques conduisent à l'activation et la prolifération des Th17 qui sécrètent Il-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26. L'environnement cytokinique (libéré par les cellules Th1/Th17) conduit à l'activation de macrophages, neutrophiles et monocytes. L'inefficacité de la régulation de la réponse immunitaire est du au déficit de T_{reg} et à la diminution de IL-10. Il-10 et TGFβ : cytokines anti-inflammatoires

D'autre part, les entérocytes régulent la perméabilité intestinale par les jonctions épithéliales. Dans les MICI, une altération des JA est décrite et consiste en une diminution de l'expression de la E-cadhérine affaiblissant ainsi l'adhérence intercellulaire. Toutefois, l'inflammation est surtout promue par la détérioration des JS. Les cytokines pro-inflammatoires comme IFNγ et TNFα induisent une diminution des protéines constitutives des JS et un réarrangement du cytosquelette d'actine par la MLCK (Clayburgh, Shen, & Turner, 2004).

De plus, il a été démontré que ces cytokines provoquent une réorganisation de nombreuses protéines des JS telles que zonuline-1, JAM-A, claudine-1 et 4 augmentant de ce fait la perméabilité intestinale.
Une diminution de l'occludine, de la claudine-5 et 8 est observé chez les patients MC. Alors qu'une augmentation de l'expression de la claudine-2 est décrite chez les patients RCH. L'enrichissement en claudine-2 a pour effet de diminuer la cohésion des contacts et d'augmenter le flux para-cellulaire. Néanmoins, l'étendue de l'altération de la barrière épithéliale est plus importante dans la RCH que dans la MC en raison du développement précoce de foyer apoptotique qui dégénère en lésion, en ulcération (Gitter, Bendfeldt, Schulzke, & Fromm, 2000; Schulzke et al., 2009).

2) Etiopathologie

Dans le monde, on constate que la répartition des MICI est inégale. En effet, la fréquence plus importante dans l'hémisphère nord (comparé à l'hémisphère sud) suggère que des facteurs ethniques et/ ou géographiques (ensoleillement, alimentation, industrialisation, agents infectieux...) influent sur la fréquence et la répartition de ces pathologies. Ainsi la population « blanche » de souche européenne court un risque supérieur de développer une MICI. De même, au sein de cette population, on note une incidence supérieure chez les juifs ashkénazes, supposant de surcroît une interaction entre les facteurs environnementaux et génétiques.

L'hypothèse physiopathologique actuelle plaide effectivement en faveur d'une prédisposition génétique à développer une « hyperactivation » de la réaction immunitaire intestinale, responsable des lésions inflammatoires et des altérations anatomiques.
La compréhension de la contribution de la génétique dans les MICI est rendue possible grâce à l'avancée des recherches dans les analyses ADN, au séquençage du génome, mais aussi par l'utilisation des bases de données internationales. Le nombre de loci associés aux MICI est

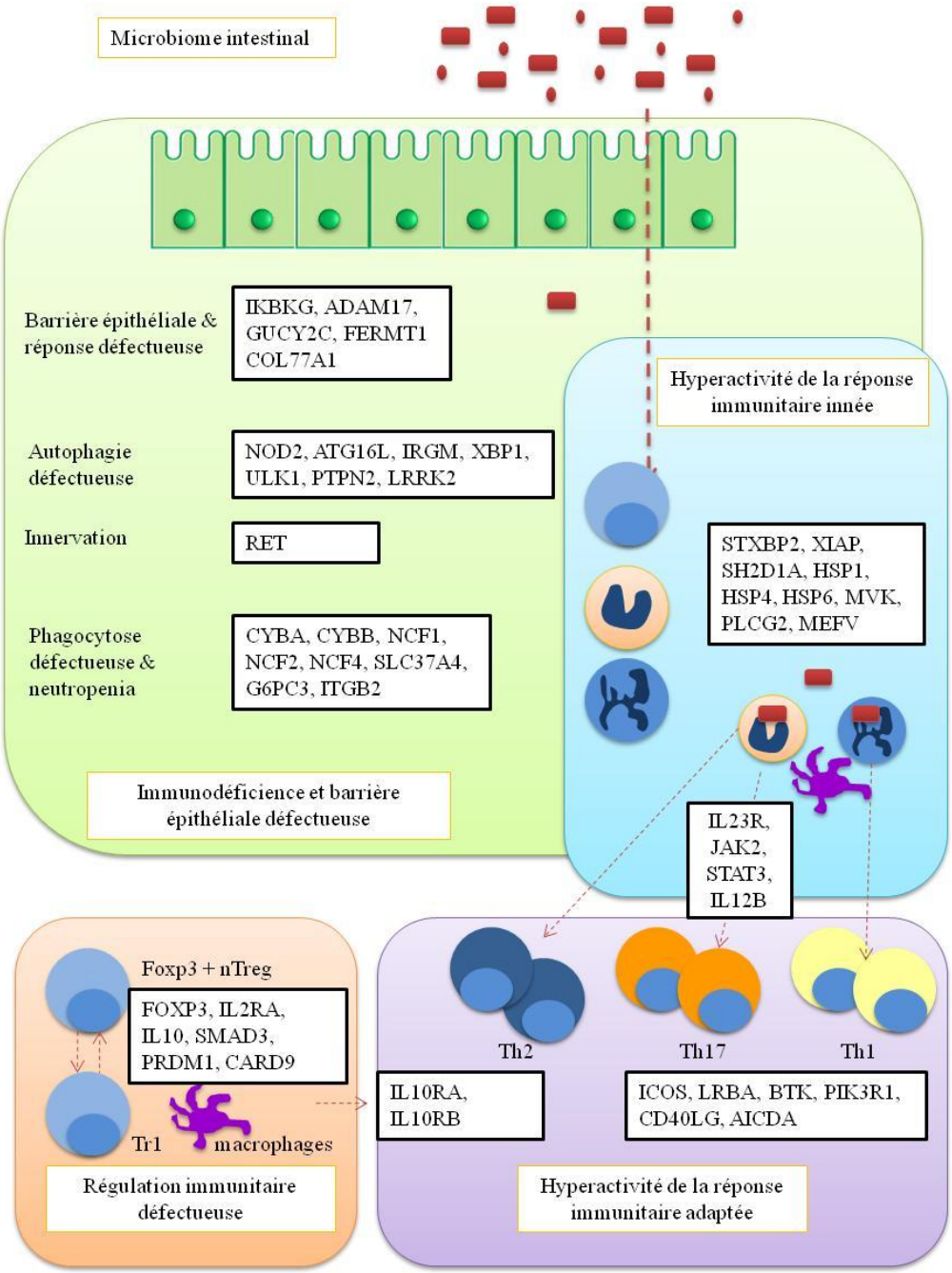


Figure 30. Facteurs génétiques et MICI.

163 loci sont associés au développement des MICI. Les mutations des ces derniers augmentent le risque de développer une MICI. Ces gènes sont impliqués dans la défense contre les pathogènes (barrière épithéliale), le maintien de l'homéostasie et la présentation des antigènes (phagocytose, autophagie). Ils sont également inclus dans les processus de l'immunité innée et adaptative (stimulation et prolifération des lymphocytes T helper [Th]) et la régulation de l'immunité (Treg).

évalué à 163 dont 110 sont associés aux deux pathologies, 30 sont spécifiques de la MC et 23 sont liés à la RCH.

Les gènes impliqués dans le développement des MICI possèdent des rôles dans différents processus tels que l'autophagie, l'inflammation, la réponse immunitaire innée et adaptée mais également dans l'interaction muqueuse-microbiote (figure 30).

Les gènes les plus étroitement associés aux MICI sont NOD2, ATG16L et IL23R. NOD2 et ATG16L sont impliqués dans le processus d'autophagie et la présentation des antigènes. IL23R code pour une sous-unité du récepteur à l'interleukine pro-inflammatoire 23, un peptide impliqué dans la génération des cellules Th 17.

Le nombre conséquent de gènes décrits dans les MICI indique que la susceptibilité génétique a une part importante dans le développement des MICI. Malgré tout, il faut souligner que l'hérédité n'explique que 20-25 % des MICI. Un nouvel horizon de recherche s'ouvre donc sur l'impact de l'interaction gènes-protéines, gènes-environnement dans la pathogenèse des MICI.

Qui plus est, de nombreux facteurs environnementaux sont considérés comme des facteurs de risque au développement des MICI tels que le tabagisme, le régime alimentaire, les anti-inflammatoires et les antibiotiques, mais aussi le stress et la dépression sans oublier la situation géographique (Y.-Z. Zhang, 2014) (tableau 1).

Il est également admis que le microbiote intestinal a une influence sur le développement des MICI. Etant donné que le microbiote intestinal est composé d'environ 1150 espèces bactériennes, on peut considérer chaque individu étant l'hôte d'environ 160 espèces. Il s'établit lors des deux premières années de vie et reste remarquablement stable. Les phyla les plus représentés sont : *Firmicutes*, 30.6–83% (*Clostridium, Ruminococcus, Eubacterium, Dorea, Peptostreptococcus, Peptococcus, Lactobacillus); Bacteroidetes*, 8–48% (*Bacteroides*); *Actinobacteria*, 0.7–16.7% (*Bifidobacterium*) et *Proteobacteria*, 0.1–26.6% (*Enterobacteriacee*) (Serban, 2014).

En examinant des segments d'intestin inflammés ou non de patients RCH et MC, il y a été observé une réduction significative de la biodiversité du microbiote fécal caractérisée par l'absence de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* tout comme une représentation importante d'*enterobactérie* (MC) et d'*E.Coli* (MC et RCH) comparée aux personnes saines. L'augmentation d'*E.Coli* associée à la muqueuse de l'iléon, du côlon et de la présence de ces bactéries dans les granulomes sont des facteurs pathogéniques primaires.

Facteurs environnementaux	MC	RCH
Tabagisme	+	-
Traitement anti-inflammatoire	+	+
Traitement antibiotique	+	+
Régime occidental: •Riche en graisse •Déficience en vitamine D	+	+
Stress: •Dépression •Anxiété	+	+
Antidépresseurs	-	-
Industrialisation : •Pollution de l'air •NO2 •SO2	+	+

Tableau 1. Les facteurs environnementaux influant sur le développement d'une MICI.

Le tabagisme augmente le risque de développer une MC alors que cela diminue le risque de développer une RCH. Les anti-inflammatoires (à haute dose, sur une longue période), les antibiotiques (surtout pendant les premières années de vie), le régime occidental, ainsi que l'industrialisation, le stress sont des facteurs augmentant la susceptibilité de développer une MICI. Les antidépresseurs permettent de diminuer les risques de MICI.
+ : stimulateur
- : inhibiteur

3) Diagnostique et marqueurs associés

De nombreux biomarqueurs ont été identifiés (tableau 2) puis utilisés pour diagnostiquer une MICI. Les deux marqueurs sérologiques les plus étudiés sont les anticorps anti-*Saccharomycete Cerivisiae* (ASCA) et les anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques (ANCA) (Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J & M., 2007).
A l'inverse des patients RCH, les patients MC sont souvent positifs pour ASCA. Cependant de nombreux individus sains présentent également ce marqueur sérologique.

Les anticorps ANCA ont une affinité pour les granules des neutrophiles. Ces anticorps sont retrouvés dans plusieurs pathologies comme l'arthrite rhumatoïde. En microscopie à fluorescence, ANCA est également observé chez les patients MC et RCH. Toutefois, chez les patients RCH le marquage est de préférence périnucléaire (pANCA).
A contrario, ce phénomène n'est pas observé chez les patients MC (Peeters, 2001; Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J & M., 2007; Sandborn WJ, Loftus EV, Colombel JF, Fleming KA, F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJHarmsen WS, Zinsmeister AR, SR., & Kaul DK, 2001).
Comme pour ASCA, de nombreux individus sains sont positifs à ce marqueur, limitant ainsi son utilisation (Bernstein CN, El-Gabalawy H, Sargent M & Rawsthorne P, Elias B, 2011).
Enfin la protéine C-réactive (CRP) est une des nombreuses protéines dont la concentration augmente dans le sérum lors d'une inflammation aiguë.
La CRP est exclusivement produite par le foie sous la stimulation d'IL-6, de TNFα et IL-1β libérés sur le site de l'inflammation. L'augmentation de CRP marque l'inflammation mais ne permet pas de différencier la MC de la RCH. Il est cependant observé dans quelques cas, que l'augmentation de CRP est plus importante dans la MC que dans la RCH.

De nombreux marqueurs fécaux peuvent être également utilisés pour déterminer la probabilité qu'un patient présente une MICI. Les deux marqueurs les plus communément utilisés sont la calprotéine et la lactoferrine.
La calprotéine est une protéine fixant le calcium et le zinc qui représente 60 % des protéines cytosoliques dans les granulocytes. De plus, la calprotéine (stable dans les fèces pendant une semaine) permet de mesurer indirectement le taux de neutrophiles infiltrés dans la muqueuse intestinale.

	Biomarqueurs	Spécificité	Utilisation
Marqueurs du sérum	ASCA	39-79% de patients MC et 5-15% de patients RCH	14-18% d'individus contrôlés positifs limitant sa valeur de diagnostique.
	pANCA	20-85% des patients MC et 2-28% des patients RCH	32% d'individus contrôlés positifs, limitant sa valeur de diagnostique.
	CRP	Marqueur d'une inflammation aïgue	Ne permet pas de différencier la MC et RCH mais permet de suivre l'état de la pathologie.
Marqueurs fécaux	Calprotéine	Marqueur sensible d'une inflammation intestinale	
	Lactoferrinec	Permet de distinguer les MICI (active et inactive) du syndrome de l'intestin irritable	

Tableau 2. Les biomarqueurs communs des MICI.

Ces biomarqueurs associés aux symptômes et aux examens cliniques permettent de diagnostiquer une MICI.

ASCA: anticorps anti-*Saccharomyces Cerevisiae*
ANCA: anticorps anti-neutrophile cytoplasmique
CRP: protéine C-réactive

D'après Bennike T et al. Biomarkers in IBD, 2014

La lactoferrine, quant à elle, est une protéine liant le fer qui se trouve dans les granules des neutrophiles et dans le sérum. Par ailleurs, elle est résistante à la dégradation et à la protéolyse faisant d'elle un marqueur de l'inflammation primé. Gisbert *et al*. estiment que la lactoferrine permet d'identifier un patient MICI avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 82%. Plusieurs études rapportent la même performance pour la calprotéine.
Malgré ces nombreux marqueurs, aucun d'eux ne permet de différencier la MC de la RCH. Actuellement, le diagnostic est basé sur une combinaison de plusieurs symptômes (tableau 3), d'examens cliniques, radiologiques, endoscopiques et histologiques ce qui permet d'accéder à la sévérité de la pathologie et de mettre au point une stratégie thérapeutique adéquate.

4) Les modèles animaux d'inflammation digestive

Afin d'étudier à la fois les mécanismes cellulaires sous-jacents aux MICI et des nouvelles cibles thérapeutiques, des modèles animaux d'inflammation digestive ont été élaborés.
Au niveau de l'intestin grêle, l'instillation de toxines bactériennes telles que la *Clostridium difficile* toxine A permet d'étudier l'inflammation aiguë observée dans les entéropathies. Différents agents chimiques peuvent également être administrés. Ainsi, l'acide trinitrobenzène suflonique (TNBS), modèle classique de MC, et le dextran sulfate de sodium (DSS), modèle expérimental de RCH, sont utilisés dans le but de reproduire les atteintes anatomopathologiques des MICI.

Le TNBS est un haptène dilué dans l'éthanol. Il est administré par instillation intra-rectale. Sa pénétration dans les tissus du tube digestif est favorisée par l'éthanol. Cela conduit à la modification des motifs antigéniques des molécules du soi et au développement d'une maladie auto-immune. Les animaux présentent alors des atteintes transmurales, au niveau du côlon, caractéristiques de la MC.
Le DSS préalablement dissout dans l'eau de boisson des animaux induit des lésions sur l'ensemble du tube digestif. Cependant, le segment colorectal présente des hémorragies, des atteintes de la muqueuse et de la sous-muqueuse comme celles observées chez les patients atteints de RCH.

De plus, les profils immunitaires cytokiniques retrouvés dans ces modèles expérimentaux (TNBS et DSS) corrèlent avec ceux observés chez les patients atteints de MICI (respectivement MC et RCH) (C. Daniel, Sartory, Zahn, Radeke, & Stein, 2008; te Velde et al., 2007).

	MC	RCH
Symptômes (devant être présents pendant 4-6 semaines)	•Diarrhée avec sang/mucus •Diarrhée nocturne •Saignement rectal •Douleur abdominale •Perte de poids •Puberté retardée, trouble de croissance •Histoire familiale	•Diarrhée •Saignement rectal •Douleur abdominale lors de la défécation
Examens de laboratoire	•Taux CRP (élevé) •Taux Calprotéine (élevé) •Sédimentation des erythrocytes (élevé) •Taux de fer (anémie) •Vit B12 (déficience) •Thrombocytose •Hypoalbumine •Anticorps ASCA	•Taux de fer (anémie) •Hypoalbumine •Anticorps pANCA
Examen histologique	•Inflammation chronique discontinu •Crypte irrégulière •Inflammation transmurale •Granulomes •Augmentation des lymphocytes intra-épithéliales	•Plasmacytose •Dépletion des mucines •Dépletion des cellules de Gobelet •Distorsion des cryptes

Tableau 3. Diagnostiquer une MICI est permis par l'association de symptômes, d'examens cliniques et histologiques. Cette combinaison permet également de différencier la MC et la RCH, ainsi que de déterminer la sévérité de la pathologie et de mettre en place une stratégie thérapeutique.
D'après Conrad et al. autoimmunity reviews 13, 2014
D'après Laas et al. autoimmunity reviews 13, 2014

Des modèles génétiques ont également été élaborés, en invalidant (KO) des gènes impliqués dans les processus anti-inflammatoires comme IL-10, muc2. Ces animaux développent de façon spontanée une inflammation digestive.

En effet, avant l'âge de six semaines les souris $IL10^{-/-}$ présentent une anomalie de la perméabilité de la barrière épithéliale au niveau de l'iléon et une augmentation de l'expression de TNFα et IFNγ (Madsen et al., 1999). Quant aux souris $Muc2^{-/-}$, certaines caractéristiques de la RCH sont retrouvées dans leur organisme comme l'expression du TNFα, des diarrhées, la présence de sang dans les selles (Van der Sluis et al., 2006).

II. La transition épithelio-mésenchymateuse (TEM)

La TEM est un processus physiologique important durant l'embryogenèse. Ce mécanisme réversible provoque à la fois la perte des caractéristiques épithéliales et le gain des propriétés des cellules mésenchymateuses plus mobiles (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009).
La TEM est également observée en réponse à une lésion, lors de la fibrose d'un organe ou lors de la cancérogenèse. Cependant, dans le cadre du cancer, ce processus semble avoir été détourné pour faciliter la diffusion de tumeur métastatique. Elle peut être induite par de nombreux signaux impliquant des facteurs de croissance (HGF, FGF, IGF..), des cytokines (TGF-β), la perte d'expression de la E-cadhérine (pour revue (Hotz, Hotz, & Buhr, 2011)). La complexité des mécanismes sous-jacents à la TEM n'a pas encore été totalement élucidée, et implique de nombreuses altérations cellulaires. Ces changements nécessitent des réseaux de régulation comme la transcription de gènes associés à la TEM ainsi que l'activation des voies de signalisation (Nieto, 2013). Cela induit la modification de la polarité cellulaire, du cytosquelette d'actine, du contact cellule-cellule conduisant à des changements morphologique des cellules et des interactions cellule-MEC responsable de la migration. D'ailleurs, les MMP1, 2, 3, 7 et 14 sont augmentées pour favoriser le détachement des cellules et la pénétration de la MEC.
Lors de la TEM, il est observé une perte de l'expression de gènes épithéliaux (E-cadhérine, cytokératine,...) concomitante avec le gain de marqueurs mésenchymateux (comme la vimentine, la N-cadhérine ou fibronectine) (Bednarz-Knoll, Alix-Panabières, & Pantel, 2012). La répression des gènes épithéliaux est au centre de l'altération de ces réseaux de régulation. La perte de la E-cadhérine, en particulier, est considéré comme un marqueur important de la TEM. Les facteurs de transcription qui répriment la E-cadhérine comprennent la superfamille des SNAIL (protéines à doigts de zinc comprenant SNAI1, SNAI2 et SNAI3), la famille ZEB (ZEB1, ZEB2 et ZEB3), E47 et KLF8, qui sont des répresseurs directs, ainsi que TWIST1, TWIST2, CGC, SIX1, E2.2 et FOXC2, agissant indirectement (Thiery et al., 2009). Les caténines sont également dissociées des JA et se délocalisent dans le noyau où elles potentialisent les évènements conduisant à la TEM (F van Roy & Berx, 2008).
En outre, le concept de plasticité épithéliale et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux plus robuste (y compris la résistance à l'apoptose) confère un avantage de survie pour les cellules tumorales en permettant l'intravasion et l'exposition à la circulation ainsi que leur extravasion ultérieure et la dissémination métastatique.

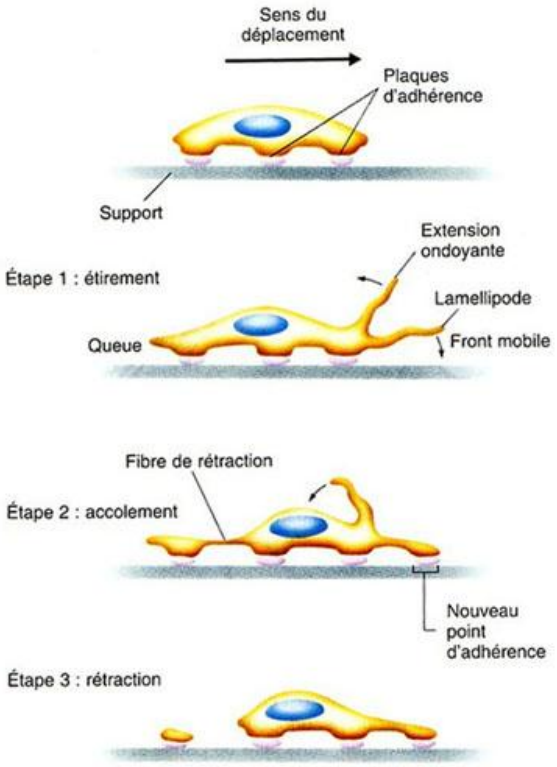


Figure 31. Les étapes de la migration.

La migration nécessite donc une polarisation des cellules où leurs cytosquelettes d'actine sont utilisés comme support pour se mouvoir dans une direction donnée. Le mouvement de la cellule peut être divisé en trois étapes :
i) la déformation du cytosquelette et la formation d'une protusion dans la direction de la migration
ii) la formation de nouvelles interactions entre la cellule et la MEC
iii) le déplacement de l'ensemble de la cellule et le désassemblage des adhérences focales par endocytose des intégrines suivi du recyclage des ces protéines d'adhésion au front de migration pour permettre de former de nouvelles adhérences focales.
D'après Lodish et al., 1997.

III. La migration et l'invasion cellulaire

Deux types de migration cellulaires collaborent pour permettre le remodelage tissulaire lors de l'embryogenèse, de la réponse immunitaire, de la réparation tissulaire ou dans les pathologies comme les inflammations chroniques et la cancérogenèse (Friedl & Gilmour, 2009; Thiery et al., 2009):

i) la migration individuelle

ii) la migration collective

Ces deux processus nécessitent un dialogue entre les complexes d'adhérence : Lors de la TEM, la migration individuelle conduit à la dissociation des contacts intercellulaires au profit d'un enrichissement des interactions cellules-MEC. Tandis que la migration collective est un mouvement de cellules directionnel caractérisé par le maintien des contacts intercellulaires (pour revue (Etienne-Manneville, 2014; Rørth, 2009)).

Le déplacement des cellules s'apparente à la progression d'un escaladeur sur une paroi rocheuse : le grimpeur étend le bras trouve une prise, s'accroche à celle-ci puis déplace l'ensemble de son corps en prenant appuie sur cette prise tout en lâchant les prises dont il n'a plus besoin. La migration nécessite donc une polarisation des cellules où leurs cytosquelettes d'actine sont utilisés comme support pour se mouvoir dans une direction donnée. Le mouvement de la cellule peut être divisé en trois étapes (figure 31) :

i) la déformation du cytosquelette et la formation d'une protusion dans la direction de la migration

ii) la formation de nouvelles interactions entre la cellule et la MEC

iii) le déplacement de l'ensemble de la cellule et le désassemblage des adhérences focales par endocytose des intégrines suivi du recyclage des ces protéines d'adhérence au front de migration pour permettre de former de nouvelles adhérences focales.

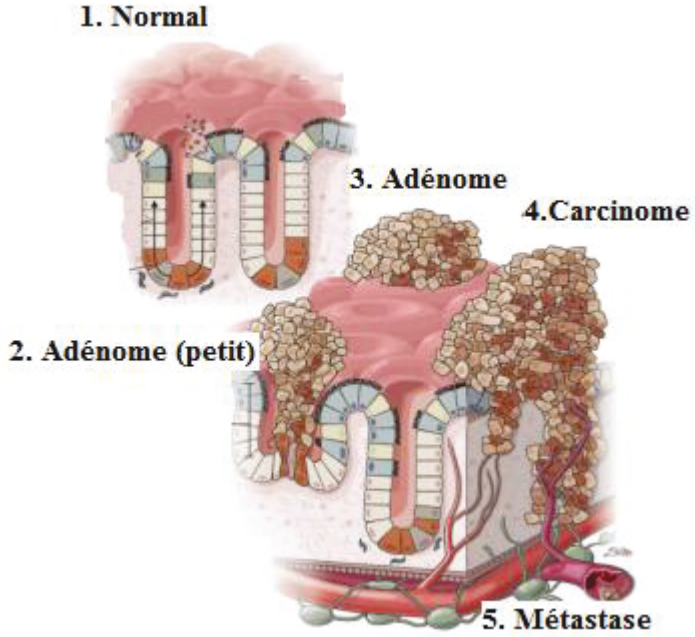
La déformation du cytosquelette à l'avant de la cellule est permis par la polymérisation des filaments d'actine qui poussent la membrane plasmique dans le sens de migration et induit la formation de protusions telles que les filopodes (de faible diamètre et cylindriques) et les lamellipodes (larges et aplatis). Ces deux structures particulières diffèrent également par leur architecture : les filopodes sont composés de filaments d'actine tous disposés dans la même direction alors que les lamellipodes sont formés par des filaments d'actine organisés en réseaux bidimensionnels.

La répartition différentielle des Rho GTPases où Rac et Cdc-42 s'expriment à l'avant de la cellule tandis que Rho-A est localisée à l'arrière de la cellule permet de réguler d'une part la formation des protusions et d'autre part de réguler le processus d'adhérence.
En effet, il a été montré que Rac induit la formation de lamellipode autour de la cellule, Cdc-42 provoque l'apparition des nombreux filopodes tandis que Rho contrôle la formation de fibre de stress (Hall, 1998; Ridley, Paterson, Johnston, Diekmann, & Hall, 1992).
Par ailleurs, Rho régule la formation et la maintenance des adhérences focales. Rac et Cdc-42, quant à elles, contrôlent les complexes focaux formés par les lamellipodes et les fillopodes (Nobes & Hall, 1995).

Au niveau intestinal, ces mécanismes de migration sont impliqués dans le renouvellement de la barrière intestinale permettant ainsi le déplacement des cellules en cohorte de la base de la crypte à l'extrémité des villosités (dans l'intestin grêle) ou à la surface de l'épithélium (dans le côlon).
Par ailleurs, la réparation de l'épithélium, la migration des cellules et suffisante. Tandis que lors de la progression tumorale, les cellules migrent et évoluent à travers la MEC par la digestion de cette dernière.
Le remodelage de la lame basale est assuré par l'expression de métalloprotéases (MMP). Au niveau de la muqueuse intestinale, les cellules épithéliales ainsi que les cellules mésenchymateuses expriment différentes MMP (Sengupta & MacDonald, 2007). L'expression de certaines MMP est augmentée dans les MICI ou dans les cancers. Ainsi, il est observé une augmentation de MMP1, 2, 3, 7 et 9 dans les cancers colorectaux (Wagenaar-Miller, Gorden, & Matrisian, 2004; Zucker & Vacirca, 2004).

Figure 32. La progression tumorale.

Dans le côlon, les cellules prolifératives, cellules souches et progénitrices se situant dans les cryptes, sont le plus exposés aux mutations de part leur longévité. La formation de cryptes aberrantes (FCA) hyperplasiques ou dysplasiques est la première modification morphologique pré-cancéreuse ; le développement des FCA évolue en adénomes puis en carcinomes.
Les cellules tumorales produisent également des molécules induisant l'angiogenèse. Ce phénomène permet d'irriguer la tumeur et ainsi de lui fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance.
De part son caractère invasif, certains carcinomes conduisent à la formation de métastases. La présence de vaisseaux sanguins et lymphatiques permet la dissémination des métastases qui s'implantent principalement dans la région thoracique et abdominale.
D'après Irrazàbal, 2014.



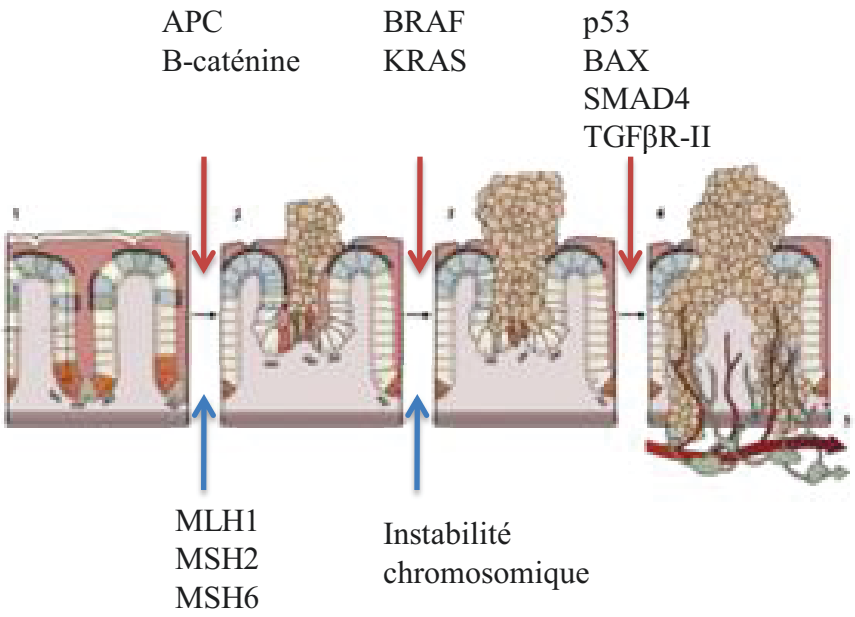


Figure 33. Les mutations et les voies de signalisation qui affectent l'initiation et la progression tumorale.

Le développement du cancer colorectal (CCR) est associé à de nombreuses mutations incluant la perte et le gain de fonctions et d'altérations épigénétiques. Les flèches bleues montrent les gènes activés alors que les flèches rouges indiquent les gènes suppresseurs de tumeurs rendus silencieux aux différentes étapes de la cancérogenèse.
D'après Irrazàbal, 2014.

IV. Le cancer colorectal (CCR)

Les cancers se développement généralement à partir de cellules prolifératives qui acquièrent des mutations génétiques ou épigénétiques. Dans le côlon, par exemple les cellules prolifératives, les cellules souches et progénitrices se situant dans les cryptes, sont le plus exposés à ces instabilités de part leur longévité. La formation de focus de cryptes aberrantes (FCA) hyperplasiques ou dysplasiques est la première modification morphologique précancéreuse (Gupta & Schoen, 2009); le développement des FCA évolue en adénomes puis en carcinomes (figure 32).

Les adénomes sont des tumeurs bénignes aisément reconnaissables lors d'une endoscopie, et leur résection constitue le meilleur moyen de prévenir la progression tumorale. Les tumeurs colorectales, quant à elles, forment dans 85% des cas des adénocarcinomes, dans 10-15% des adénocarcinomes mucineux (plus de 50% de mucine) et le reste des cas représentent des formes rares.

Du point de vue histologique, leur grade est défini par le niveau de différenciation des cellules ainsi que par leur pouvoir invasif, c'est à dire : moins les cellules sont différenciées, plus le grade est élevé.

Les cellules tumorales produisent également des molécules induisant l'angiogenèse. Ce phénomène permet d'irriguer la tumeur et ainsi de lui fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance.

De par leurs caractères invasifs, certains carcinomes conduisent à la formation de métastases. Dans ce contexte, apparait effectivement une modification de l'expression des molécules d'adhérence, de la production de MMPs responsables de la perte de contact avec la tumeur primaire, mais aussi une modification de la digestion de la matrice puis une invasion des cellules métastatiques.

La présence de vaisseaux sanguins et lymphatiques permet la dissémination des métastases qui s'implantent principalement dans la région thoracique et abdominale.

1) Le cancer : une pathologie multifactorielle

Le cancer est une pathologie multifactorielle qui résulte de différentes interactions entre la génétique, l'épigénétique, l'immunité, l'environnement (statut socio-économique, géographique), le mode de vie, le régime alimentaire. En outre, ces paramètres peuvent aussi interagir avec la flore intestinale (Serban, 2014).

Alors que le risque de développer un CCR chez une personne saine n'est que de 5%, on constate que les patients atteints d'une MICI courent un risque plus élevé qui dépend de la durée et du nombre de poussées inflammatoires. En effet, le risque de développer un cancer colorectal associé aux colites (CAC) est de 7% 20 ans après le début de la pathologie, entre 7 et 14 % après 25 ans, pour atteindre 30% après 35 ans.

La majorité des cancers intestinaux se développent au niveau du côlon, dont 70% environ sont localisés dans le sigmoïde. Le CAC apparait quand l'homéostasie cellulaire et tissulaire est interrompue par des mutations ou des altérations épigénétiques (méthylation de l'ADN ; modification d'histones), de certains gènes responsables de la prolifération (APC, Ras..), la différenciation (TGF-β, Notch...) et la survie cellulaire (DCC, Bax..) (figure 33).

a. Le microbiote

Dans des conditions saines, la flore intestinale et l'hôte humain établissent une relation symbiotique, bénéfique aux deux partenaires. Le microbiote est impliqué dans la tumorogenèse, sa structure et ses caractéristiques sont altérées dans les CCR et les lésions pré-cancéreuses. Cependant, la question est de savoir si ces modifications sont imputables à des causes du développement tumoral ou si ce sont des conséquences de l'induction de la tumorogenèse (Hartnett & Egan, 2012; Terg et al., 2008).

Par ailleurs, il a été mis en évidence que les souris exemptées de germe (germ free ou GF) développent moins de colites ou de tumeurs comparées aux animaux conventionnels. Les souris $IL10^{-/-}$ traitées à l'AOM développent un CAC en présence de *Bacteroïdes Vulgaris* alors que les animaux GF ne développent pas de tumeur.

Le microbiote peut également contribuer au CCR *via* une dysbiose ou à un changement de l'activité métabolique du microbiote.

On note chez les patients CCR une diminution du phyla *Bifidibacterium*, particulièrement de *Bifidibacterium longum* et une augmentation de *Proteobacteria*, *Dorea spp*, *Coprococcus.*

De façon surprenante, le CCR est associé à une sur-représentation de bactéries commensales comme les *Coriobacteridae* ou les *Fusobacterium nucleatum*. Ces dernières sont des bactéries $Gram^-$ qui promeuvent le développement du CCR ou l'accélération de la tumorogenèse dans les adénocarcinomes existants en libérant un facteur virulent, le FadA.
C'est une molécule d'adhérence qui facilite l'attachement et l'invasion des microbes aux cellules épithéliales (Han et al., 2005; M. Xu et al., 2007). FadA induit une dissociation des jonctions intercellulaires et par conséquent une augmentation du transport para-cellulaire. Cela simplifie la pénétration des bactéries à travers l'épithélium et active le système immunitaire de l'hôte (Fardini et al., 2011).
D'autre part, FadA active la signalisation de la β-catenine, de l'expression de certains gènes tels que des facteurs de transcription, des marqueurs de cellules souches et des facteurs stimulant la prolifération cellulaire (Rubinstein et al., 2013).

Au niveau de l'activité métabolique, on observe une augmentation de certains acides aminés (valine, leucine, isoleucine, glutamate, tyrosine) alors que le glucose, le pyruvate et le butyrate diminuent (Serban, 2014). Le butyrate est une source énergétique des cellules épithéliales intestinales. Il module de façon dose dépendante l'expression de certains gènes lui conférant ses propriétés protectrices contre le CCR. En effet, le butyrate a un pouvoir antiprolifératif et une habilité à augmenter l'apoptose et la différenciation (Irrazábal, Belcheva, Girardin, Martin, & Philpott, 2014).
On note également une augmentation du taux de lactate, utile à la production de H_2S par les bactéries. Le lactate est une source d'énergie utilisée pendant la réduction de SO_4^{2-} à H_2S. Ce dernier est lié au développement du CCR en augmentant la prolifération et en diminuant l'apoptose (Deplancke et al., 2003).

Par ailleurs, certains membres du microbiote possèdent la capacité de produire des composés cytotoxiques qui influencent la tumorogenèse en induisant des mutations dans les cellules exposées à ces molécules. Des toxines, l'oxyde nitrique, les ROS directement synthétisés par les bactéries intestinales provoquent des dommages géniques. Ainsi, le colibactine et la toxine de distension cytholétale (CDT) produites par les bactéries $Gram^-$ induisent une cassure du double brin d'ADN (Serban, 2014).

Cependant, de nombreuses études mettent en évidence l'activité anti-cancéreuse des probiotiques dont le groupe de bactéries qui produit de l'acide lactique comme métabolite primaire du glucose (LAB pour *lactic acid bacteria*). Les LAB comprennent les

Prévention	Espèce bactérienne	Fonction
Apoptose	*Lactobacillus acidophilus*	Croissance cellulaire et différenciation Induction de Beclin-1 et GRP78
	L. reuteri	Prolifération et survie cellulaire
	L. Casei et L. acidophilus	Induction de l'apoptose
Dommage oxydatif	*Bifidobacterium longum, L. acidophilus*	Activité anti-oxydative; inhibition de la peroxidation de l'acide linoléique
	Streptococcus thermophilus	Libération de ROS
Amélioration du système immunitaire	*L. acidophilus*	Stimule les cellules dendritiques à produire l'IL-10
	L. acidophilus déficiente en acide lipoteichoïque	Augmente la densité des Treg
	L. acidophilus, L. casei, B. longum	Augmente le nombre total de LT; NK
	L. Casei Shirota	Induit la production de cytokines comme TNFα; IFNγ
Épigénétique	*L. acidophilus déficiente en acide lipoteichoïque*	Induit l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs

Tableau 4. Activité anti-cancéreuse des probiotiques dont le groupe de bactérie produisant de l'acide lactique comme métabolite primaire du glucose (LAB pour *lactic acid bacteria*).

Lactobacillus, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* (Zhong, Zhang, & Covasa, 2014). Les LAB inhibent l'initiation et la progression de la carcinogenèse *via* différents mécanismes (comme l'autophagie, l'activité anti-oxydante, la régulation de l'immunité) (tableau 4).

b. Le régime alimentaire et le tabagisme

De nombreux composés alimentaires influencent le risque de développer un CCR (figure 34). Globalement, un risque élevé de CCR est associé à une forte consommation de viande rouge, de céréales raffinées, de bonbons, d'alcool et à une faible consommation de fruits et de légumes (Austin et al., 2007). La viande rouge produit des amines hétérocycliques durant la cuisson tels que le 2-amino-3-methyl-3H-imidazol[4, 5-f]quinoline (IQ) qui est considéré comme un pro-carcinogène (Ohgaki et al., 1986). Les bactéries anaérobies telles que *Eubacterium spp* transforment IQ en IQ-7 one connu pour être un mutagène. IQ a la faculté d'induire des mutations géniques, des échanges entres les chromatides sœurs, une synthèse d'ADN inopportune (Irrazábal et al., 2014).
L'alcool est également impliqué dans le développement du CCR. Les bactéries commensales comme *E.Coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* expriment l'alcool déshydrogénase, une enzyme qui catalyse la fermentation de l'éthanol à l'acétaldéhyde connu pour ses propriétés carcinogéniques.
Par ailleurs, le tabagisme est un facteur influençant la tumorogenèse. Cette notion sera développée dans le chapitre IV.

c. Le stress

Le stress est un processus complexe qui protège l'organisme des menaces potentielles et initie des cascades d'activation, incluant le système sympathique et l'axe hypothalamique-pituitaire-surrénal (HPA) (Antoni et al., 2005; Thaker, Lutgendorf, & Sood, 2007).
Les hormones du stress telles que l'épinephrine, la norépinephrine ou le *Corticotropin releasing factor* (CRF) sont synthétisées lors de stress aigu ou chronique. Elles induisent la prolifération, l'adhérence et la migration (Lin et al., 2013). Il a d'ailleurs été observé que le stress augmente la mortalité chez les femmes atteintes de CCR (Kojima et al., 2005). L'implication du stress dans le développement tumoral sera plus longuement explicitée dans le chapitre IV.

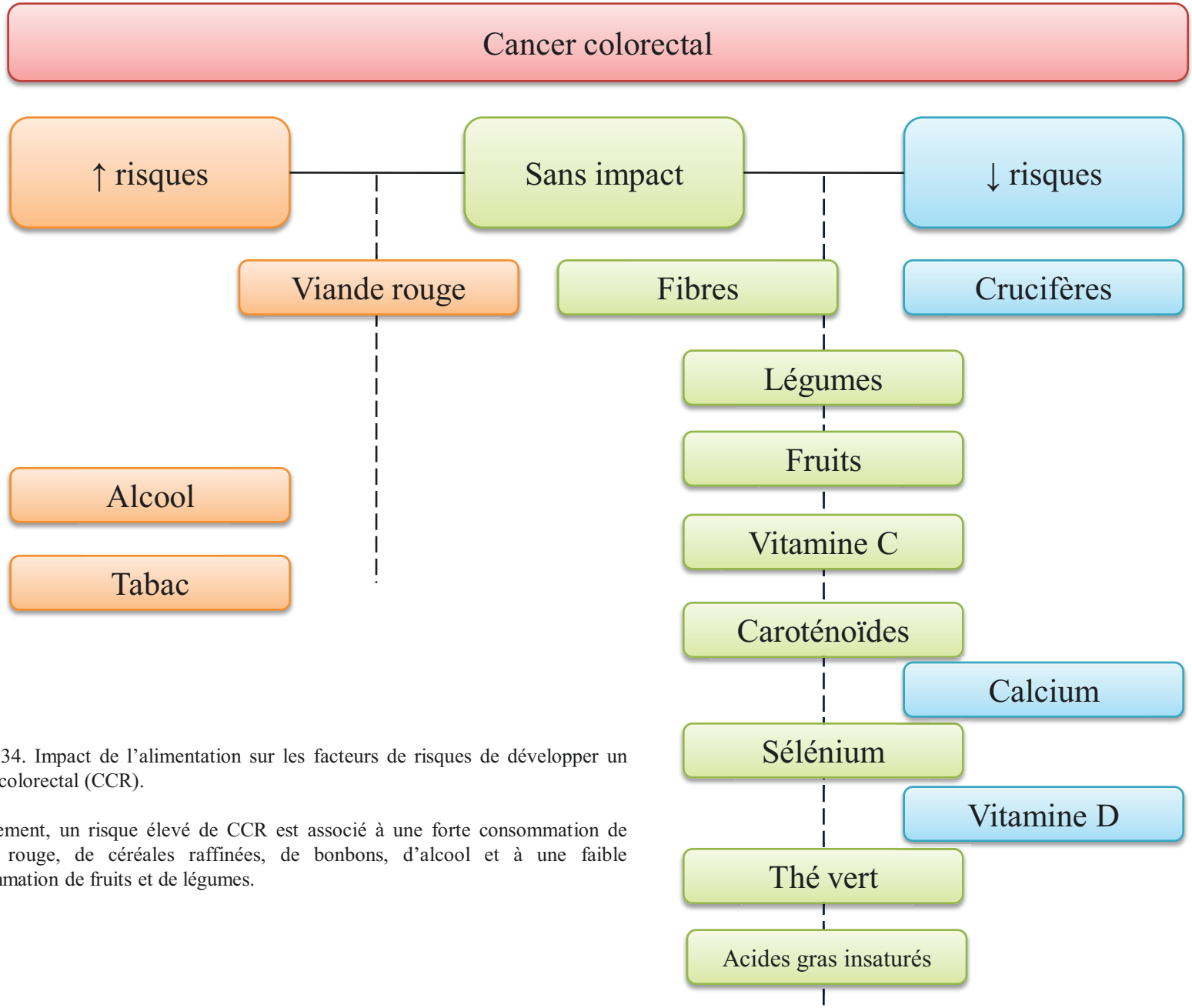


Figure 34. Impact de l'alimentation sur les facteurs de risques de développer un cancer colorectal (CCR).

Globalement, un risque élevé de CCR est associé à une forte consommation de viande rouge, de céréales raffinées, de bonbons, d'alcool et à une faible consommation de fruits et de légumes.

d. Régulation génétique dans le développement du CCR :

i. Instabilité génétique :

Une centaine de mutations sont observées dans le génome d'un patient CCR. Des études approfondies au cours des dernières décennies ont montré que la majorité des altérations géniques ne possède pas de rôle pathogénique dans la formation cancéreuse. Seulement une quinzaine de gènes sont des variations géniques qui sont fonctionnellement importantes et positivement sélectionnées pendant la carcinogenèse (van Engeland, Derks, Smits, Meijer, & Herman, 2011; L. D. Wood et al., 2007). Ces altérations affectent une grande diversité de fonctions cellulaires comme la prolifération, la migration, la différenciation, la mort cellulaire, la réparation et la stabilité de l'ADN.

L'instabilité génétique (INC) se caractérise par une aneuploïdie, par une perte ou un gain chromosomique ou par les instabilités microsatellitaires. L'INC est illustrée par l'insertion ou la délétion de paires de bases dans les séquences répétées d'ADN. Environ 85 % des CCR sont particularisés par des INC avec une perte (5q, 8p21-pter, 15q11-q21, 17p12-13, 18q12-21) ou un gain chromosomique (1q32, 7p, 7q, 8q, 13q, 20p, 20 q).
En effet, cette instabilité génique engendre la perte du bras long du chromosome 5 contenant le gène APC ce qui induit des cryptes aberrantes dysplasiques. De plus, la perte du bras court du chromosome 17 favorise la progression tumorale ; il porte le gène p53, acteur de la voie Wnt.
On note également des variations géniques dues à l'instabilité chromosomique dans la voie de signalisation de TGFβ comme le récepteur de TGFβ de type II (30% des CCR), SMAD2, SMAD4, RUNX3 et TSP1 ou de la voie de MAPK telles que BRAF et KRAS (55-60% des CCR) (Derynck, Akhurst, & Balmain, 2001; Eppert et al., 1996; Takaku et al., 1998; L. D. Wood et al., 2007).
Ces mutations contribuent à la formation tumorale par l'activation d'oncogène et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui régulent les voies de signalisation (figure 33). Par exemple, KRAS est un proto-oncogène qui conduit à l'activation de MAPK *via* BRAF. L'activation aberrante de cette voie de signalisation induit la prolifération et supprime l'apoptose (Nosho et al., 2008; Samowitz et al., 2005).
Des altérations moins répandues sont des mutations germinales des gènes de réparations de l'ADN comme MSH2, MSH6, MLH1 et PSM2 induisent des erreurs de cadre de lecture ou

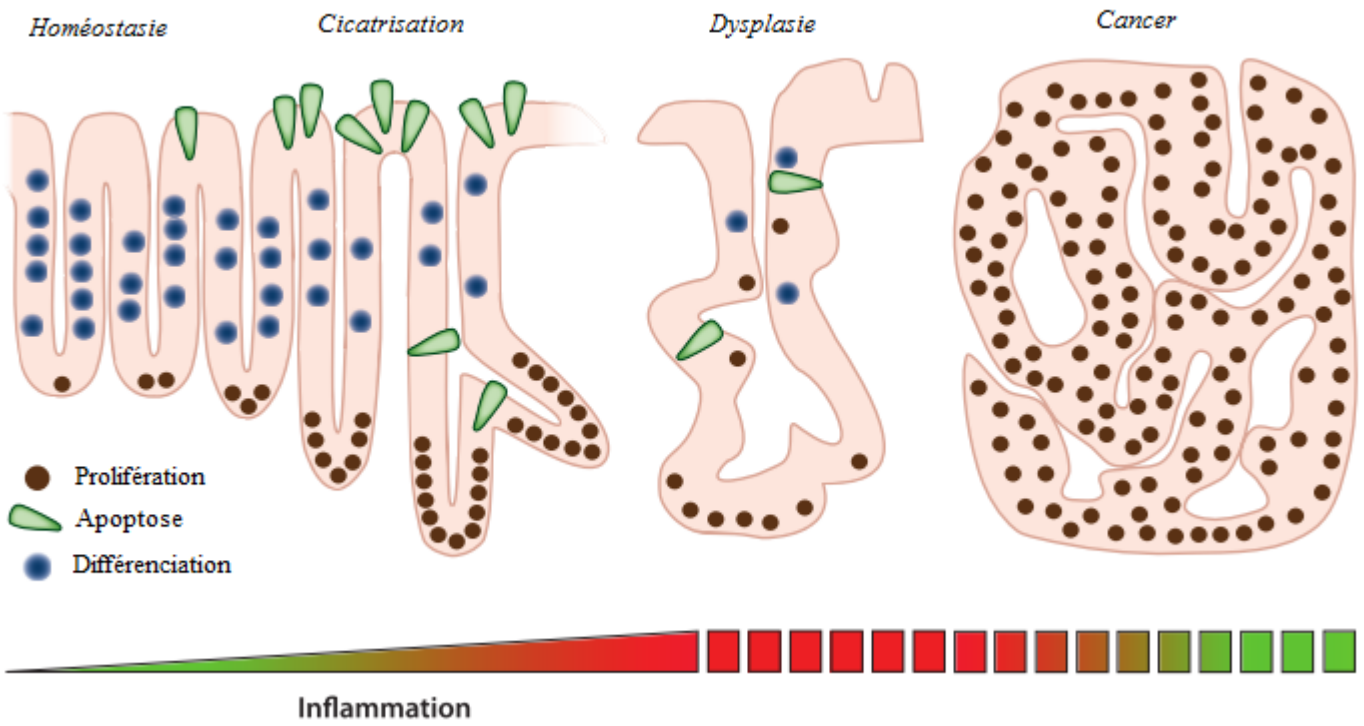


Figure 35. Représentation schématique des modifications de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose observées lors de l'inflammation et de la progression tumorale.

Il est observé une altération de la structure épithéliale et la perte de la fonction de la barrière épithéliale lors de l 'inflammation et de la progression tumorale.

des substitutions de paire de bases dans les microsatellites (Söreide, Janssen, Söiland, Körner, & Baak, 2006).

ii. Instabilité épigénétique :

L'instabilité épigénétique fait intervenir la régulation des gènes, notamment l'hyper-méthylation de certains promoteurs ou par des modifications post-traductionnelles d'histones. Cela peut conduire à la perte d'expression de gènes impliqués dans les systèmes de réparation de l'ADN et à l'augmentation de l'instabilité génique des microsatellites des gènes de prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Toyota & Suzuki, 2010). Il est également observé une hyper-méthylation de promoteurs de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération, les systèmes d'adhérence, l'apoptose ou la réparation de l'ADN (Y. Xu et al., 2012). La présence de méthylation sur les promoteurs des gènes HIC1, MDG1 et RASSF1A impliqués dans les CCR peut être recherchés dans le sang des patients et servir de biomarqueur dans le dépistage au stade précoce de ces cancers (Cassinotti et al., 2012)

2) Cancer et inflammation

Plusieurs molécules ont été identifiées comme étant des acteurs clés de la relation entre l'inflammation et le CAC et tout particulièrement dans l'initiation et le développement du CAC (figure 35).

L'émergence de modèles animaux permet d'analyser les mécanismes conduisant de l'inflammation au cancer. Pour ce faire, deux modèles murins sont communément utilisés : les souris traitées à l'azoxyméthane (AOM) et les souris *Apc* $^{-/+}$.

L'AOM est un intermédiaire du métabolisme du 1,2-Dimethylhydrazine, un composé pro-oncogénique colorectal. L'AOM provoque des tumeurs au niveau du côlon avec des lésions macro- et microscopiques similaires à celles observées dans les carcinomes et les adénocarcinomes humains (Boivin et al., 2003).

Les souris *Apc* $^{-/+}$ constituent le premier modèle de tumorogenèse gastro-intestinal. Le changement génétique du gène *Apc* imite le cancer du côlon humain où 80% des tumeurs présentent une mutation de ce gène. Le modèle de souris *Apc* $^{-/+}$ est privilégié sur le modèle AOM puisque ce dernier induit des tumeurs colorectales mais provoque également des lésions létales du foie.

Les molécules impliquées dans la relation entre l'inflammation et le CCR incluent des régulateurs facilitant la tumorogenèse comme les cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1, IL-6 ainsi que des modulateurs négatifs comme TGFβ, IL-10 réduisant la tumorogenèse.

a) Les régulateurs positifs de la cancérogenèse

Les CAC sont caractérisés par une infiltration importante de cellules immunitaires incluant les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD^{8+}, CD^{4+} et CD^{4+} CD^{25+} (Waldner, Schimanski, & Neurath, 2006).

Les TLRs ont un rôle clé comme senseur du microbiote intestinal, et leur activation est nécessaire pour conserver l'homéostasie intestinale. Cependant, ces récepteurs sont souvent perturbés dans les MICI ainsi le polymorphisme de TLR4 est associé avec la MC et la RCH (M Fukata & Abreu, 2008). TLR4 est surexprimé dans les cellules épithéliales intestinales des patients MICI. Cela induit l'activation de COX-2 engendrant la libération de prostaglandine E2 et de ROS.
De plus, les TLRs ont un rôle dans la carcinogenèse. Il a été montré que la délétion de MyD88, un adaptateur de TLR, diminue significativement le nombre et la taille des tumeurs dans un modèle murin $APC^{-/+}$ (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2007) ainsi que dans un modèle AOM- DSS mimant le développement d'un CAC (Masayuki Fukata et al., 2007).

Le TNFα est un régulateur de l'inflammation. Les souris déficientes en TNFα ou en son récepteur TNFR sont résistantes au développement de tumeur de la peau. Le taux d'ARNm et de protéine de TNFα augmentent dans les lésions gastriques et la muqueuse inflammée des patients MICI (Noguchi, Hiwatashi, Liu, & Toyota, 1998).
Par ailleurs, une libération faible et chronique de TNFα est observée dans de nombreuses tumeurs (tumeur ovarienne, de la prostate, du côlon, des poumons) (Balkwill, 2009; Szlosarek & Balkwill, 2003).
Dans un modèle murin depleté en TNFR de type I (p55) et traité à l'AOM-DSS en l'absence de voie de signalisation induite par TNFα, il est observé une diminution des lésions, des cellules immunitaires infiltrées et de l'expression des cytokines permettant ainsi une réduction de la formation des tumeurs (Popivanova et al., 2008). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans un modèle de cancer (AOM) où le nombre et la taille des tumeurs diminuent lors de l'utilisation de l'antagoniste de TNFα, l'étanercept.

L'IL-6 est considéré comme un acteur entre la transition de l'inflammation aigüe et chronique ainsi qu'entre l'immunité innée et acquise (Hoebe, Janssen, & Beutler, 2004; S. A. Jones, 2005). Un taux élevé d'IL-6 et la forme soluble de son récepteur est observé dans le sang et les tumeurs colorectales des patients MICI. De plus, la concentration d'IL-6 corrèle avec la sévérité de la pathologie. L'IL-6 possède un rôle important dans la génération de Th17, des cellules immunitaires présentes en excès dans la RCH et ayant une fonction pathogénique (Bettelli et al., 2006; Mangan, Tantravahi, Rane, & Reddy, 2006).

Dans un modèle murin AOM, le blocage d'IL-6 par l'utilisation d'anticorps spécifique anti-IL-6 conduit à une réduction de la taille et du nombre de tumeurs. D'autre part, la suppression génique de SOCS3, limitant la transcription d'IL-6, induit une susceptibilité accrue à développer des tumeurs dans un modèle murin AOM-DSS (Rigby, Simmons, Greenhalgh, Alexander, & Lund, 2007). Ces résultats corroborent des études *in vivo* sur l'expression d'IL-6 et de ses cibles épithéliales chez les patients RCH.

Li et ses collégues mettent en exergue que l'expression d'IL-6 est plus importante chez les patients CAC et RCH que chez les patients présentant une RCH en rémission et chez les contrôles.

D'autre part, l'expression de SOCS3 est augmentée chez les patients MICI par rapport aux contrôles permettant un « feeback » négatif sur la synthèse d'IL-6. En revanche, le taux de SOCS3 est diminué chez les patients développant un CAC conduisant à une augmentation de la concentration d'IL-6 (Y. Li et al., 2010).

b) Les régulateurs négatifs de la carcinogenèse :

L'IL-10 : l'interleukine 10 est un médiateur clé dans l'homéostasie de l'immunité intestinale. Les patients MICI qui présentent une mutation d'IL-10 développent une forme agressive de la pathologie (Glocker et al., 2009). Les souris IL-$10^{-/-}$ développent des CAC *via* la production de cytokines de Th1 et l'absence de contrôle d'IL-6 (Berg et al., 1996).

Le TGFβ : il est impliqué dans la pathogenèse des CAC sporadique. La mutation de TGFβ est fréquemment observée chez les patients atteints de CCR (Grady et al., 1999). Dans un modèle murin depleté en TGFβ et traité à l'AOM-DSS, il est observé un nombre plus important de tumeurs que chez les souris sauvages AOM-DSS. Comme pour l'IL-10, le TGFβ inhibe la formation tumorale dépendante d'IL-6. Cela renforce le paradigme selon lequel les molécules immunorégulatrices (comme IL-10 et TGFβ) ont un effet protecteur dans l'inflammation intestinale et le développement du CAC (Becker, Fantini, & Neurath, 2006).

	Cible	Cible cellulaire	Action	Effets secondaires
5-ASA	RCH	Agoniste PPARγ Diminue la perméabilité intestinale	Inhibe la production de prostaglandines, de leucotriènes, du chimiotactisme des neutrophiles, les radicaux libres de l'oxygène Active NFkB	Nausée, diarrhée

Tableau 5. Les 5-aminosalicylés

	Cible	Cible cellulaire	Action	Effets secondaires
Corticoïde	MC, RCH	Inhibition de l'acide arachidonique	Inhibe la synthèse de leucotriènes, histamines, prostaglandines	Fièvre, hépatite, pancréatite aiguë, lymphome cérébral (rare)

Tableau 6. Les corticoïdes.

Chapitre III. Les stratégies thérapeutiques

Synopsis :

Thérapies conventionnelles : effets secondaires, faible observance

Thérapies alternatives prometteuses telles que la neurostimulation vagale (NSV)

I. Thérapies conventionnelles :

Le but de la thérapie est double :

i) l'objectif principal consiste en un traitement d'attaque (permettant l'induction et le maintient de la rémission).

ii) le second objectif consiste, quant à lui, en un traitement d'entretien pour maintenir l'absence de symptômes ou permettre une cicatrisation complète selon le cas.

Pour ce dernier, force est de constater qu'une modification du style de vie, une médication adéquate, voir quand cela est nécessaire, la réalisation d'un acte chirurgical suffissent à améliorer l'état du patient. Cependant, il est important de souligner que ces stratégies thérapeutiques ont des effets suspensifs mais en aucun cas curatifs.

Jusqu'à présent lors des poussées inflammatoires, il était préconisé d'augmenter progressivement la puissance des outils thérapeutiques tant que l'inflammation n'était pas enrayée. Cette stratégie pyramidale est actuellement remise en question. Effectivement, on privilégiée aujourd'hui des stratégies en pyramide inversée dont l'objectif est de frapper fort en administrant un traitement spécifique afin d'entraver l'inflammation puis ensuite de le diminuer pour améliorer de manière significative la récupération post-crise.

Il y a actuellement 4 familles de substances pharmacologiques couramment utilisées dans le traitement des MICI: les salycilés, les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques. Une brève description sera réalisée pour chaque famille de substance thérapeutique, pour plus de détails se reporter au tableau associé.

i) Les 5-aminosalicylés ou 5-ASA est le traitement utilisé pour la RCH en raison de son efficacité (dans 60 à 70 % des patients RCH) (Meier & Sturm, 2011) pour sa bonne tolérance ainsi que son faible nombre d'effets secondaires. Cependant, cette famille de substance pharmacologique n'a que peu d'effet sur la MC (tableau 5).

	Cible	Cible cellulaire	Action	Effets secondaires
AZA et 6-TM	MC, RCH	Incorporation des métabolites actifs dans les nucléotides cellulaires	Inhibe la prolifération des cellules T et l'activité des natural killers	Nausée et vomissement (25%), infection opportuniste (rare), risque de lymphome (X4)
MTX	MC	Antagoniste de l'acide folique	Interrompt la synthèse d'ADN, diminue IL-1, supprime les fonctions des cellules T	Nausée (15%), infection opportuniste (rare), hépatotoxicité (rare), hypersensibilité pneumonique (rare)
CSA	RCH sévère et réfractaire	Inhibiteur de la calcineurine	Diminue les lymphokines pro-inflammatoires	anaphylaxie, épilepsie, néphrotoxicité permanent

Tableau 7. Les immunosuppresseurs.

ii) Les corticoïdes sont utilisés lors de périodes de récidives et/ ou d'échappement aux 5-ASA. Leur utilisation est souvent de courte durée en raison de leur effet secondaire et ils ne constituent pas un traitement d'entretien (tableau 6).

iii) Les immunosuppresseurs diminuent l'activité immunitaire générale et nécessitent un suivi rigoureux. Les immunomodulateurs incluent les thiopurines (6-mercaptopurine (6-MP), azathioprine (AZA)) ; methotrexate (MTX) et la cyclosporine (CSA). Bien qu'ils soient généralement bien tolérés, l'utilisation d'immunosuppresseurs conduit là aussi à de nombreux effets secondaires mineurs. Des infections opportunistes graves sont possibles mais cet évènement reste relativement rare (tableau 7).

iv) L'avancée la plus significative dans les traitements des MICI est celle concernant les thérapies biologiques découlant de l'utilisation des anticorps anti-TNF alpha. Cette cytokine est fortement augmentée dans le sang, dans les selles et dans la muqueuse intestinale chez les patients atteints MICI (Pedersen, Coskun, Soendergaard, Salem, & Nielsen, 2014). Les thérapies biologiques ciblent le TNFα avec des anticorps synthétiques anti-TNFα, permettant ainsi de réduire l'inflammation. Les thérapies biologiques incluent l'Infliximab (IFX) commercialisé sous le nom de Remicade, l'Adalimumab (ADA), le Certolizumab pegol (CZP) et le Natalizumab (NZA) (tableau 8). Même si ces thérapies sont efficaces, elles présentent néanmoins de nombreux effets secondaires sévères.

La chirurgie, quant à elle, est réservée aux formes réfractaires aux traitements pharmacologiques ou présentant des complications. En général, les chirurgies sont les plus minimalistes possibles. La technique en question consiste à apporter un soulagement rapide mais ceci dit, elle n'empêche pas pour autant les fréquentes récidives soit 80 % chez les patients MC l'année suivant la chirurgie (tableau 9).

La prévalence d'une mauvaise observance est de 30-40%. Cela s'explique par plusieurs raisons : tout d'abord par la coexistence de désordres psychopathologiques, mais aussi par de l'anxiété et de la dépression, ou encore par l'insuffisance qualitative de la relation médecin-malade et enfin par les nombreux effets secondaires des thérapies conventionnelles. Par conséquent on peut dire q'une mauvaise observance conduit à un risque de rechute et de CCR plus élevé. (Tahri, 2007).

L'amélioration de l'observance implique donc des approches thérapeutiques qui non seulement prennent en charge la maladie, mais aussi le vécu psychologique du patient et son environnement social. Elles peuvent être, bien entendu, utilisées en complément du traitement habituel.

	Cible	Cible cellulaire	Action	Effets secondaires
IFX	MC et RCH	Anticorps monoclonal chimérique (75% humain, 25% souris) anti-TNFα	Se lie au TNFα soluble et à son précurseur membranaire , une cytokine pro-inflammatoire puissante , bloquant l'interaction de la cytokine et du récepteur de type 1 ou 2 (TNFR1, TNFR2)	Infection (32%) dont tuberculose et septicémie, syndrome type lupus (rare), développement d'anticorps anti-IFX et anti-ADA, risque de lymphome
ADA	MC et RCH	Anticorps monoclonal recombinant anti- TNF α (humain)		
CZP	MC, prescrit aux femmes enceintes (pas de transport par le placenta)	Anticorps anti-TNFα délété de sa portion Fc		Faible développement d'anticorps anti-CZP
NZA	MC, patient ayant une faible réponse à IFX	Anticorps monoclonal anti IgG4 (humain)	Se lie aux intégrines alpha 4	Leukoencephalopathie multifocale

Tableau 8. Les thérapies biologiques : anti-TNFα.

	Cible	Effets secondaires
Acte chirurgical	MC avec fistule et sténose RCH avec risque aggravé vers une forme maligne	Récidives chez les patients MC. Selles multiples et liquides, risque d'incontinence fécale chez les patients RCH

Tableau 9. La chirurgie.

II. Thérapies non conventionnelles

L'utilisation d'anxiolytiques et d'antidépresseurs mais aussi de médecines alternatives comme l'hypnose donne des résultats prometteurs pour les patients et pourrait aider la prise en charge des MICI en complément des thérapies conventionnelles (Emami, Gholamrezaei, & Daneshgar, 2009; Pellissier, Dantzer, Canini, Mathieu, & Bonaz, 2010).

D'autre part, la flore intestinale est de plus en plus ciblée par le développement de probiotiques destinés à diminuer l'inflammation et à favoriser la réparation digestive en produisant des molécules anti-inflammatoires de manière locale (Grimoud et al., 2010; Pothoulakis, 2009).

Par exemple, la levure non pathogène *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) est considérée comme un probiotique efficace (Czerucka, Piche, & Rampal, 2007) grâce à :

i) sa résistance au pH acide comme dans le tractus digestif ;

ii) sa température de fonctionnement (37°C) ;

iii) sa résistance aux antibiotiques anti-bactériens (Bergogne-Bérézin, 1995; Czerucka, Dahan, Mograbi, Rossi, & Rampal, 2000).

Il a été démontré que *Sb* additionnée au 5-ASA permet une rémission de patients RCH (Guslandi, Giollo, & Testoni, 2003).

En effet, il est suggéré que *Sb* peut moduler la réponse inflammatoire de la cellule hôte, et peut secréter des facteurs facilitant la restauration de l'épithélium intestinal (Canonici et al., 2011). Dans un modèle de colite aiguë chez la souris traitée au TNBS, *Sb* protège la muqueuse intestinale des dommages histologiques, par l'inhibition de NfκB conduisant à la diminution de l'environnement cytokinique pro-inflammatoire.

De plus, *Sb* sécrète un facteur anti-inflammatoire, le *Saccharomyces anti-inflammatory factor* (SAIF) qui inhibe la production d'IL-8 (Sougioultzis et al., 2006) et réduit la réponse des cellules intestinales aux cytokines pro-inflammatoires (Lee, Kim, Chi, Joo, & Kim, 2009).

En plus de l'effet anti-inflammatoire, *Sb* a une incidence sur l'épithélium intestinal. Des études menées *in vivo* chez le rat ont mis en évidence que *Sb* augmente l'expression de la sucrose-isolmatase ce qui permettrait d'augmenter le degré de différenciation des cellules absorbantes de l'intestin (Buts, Bernasconi, Van Craynest, Maldague, & De Meyer, 1986; Jahn et al., 1996).

Gene	Fonction	Polymorphisme	MICI associé
ATG16L	Utile à l'assemblage de l'autophagosome	rs2241880	MC
NOD2	Initiateur de l'autophagie, recrute ATG16L	rs2066844, rs2066845, rs2066847	MC
XBP1	Facteur de transcription associé à la maturation de l'autophagosome	De nombreux polymorphismes d'un unique nucléotide	MC
IRGM	Régulation de la formation de l'autophagosome	rs10065172, rs13361189	MC
LRRK2	Contrôle de la maturation de l'autophagosome		MC
ULK1	Régulation du complexe d'intitiation	Polymorphisme d'un nucléotide	MC
PTPN2	Régule la formation de l'autohpagosome en réponse à IFN-γ et TNF-α	rs2542151, rs1893217	MC et RCH

Tableau: 10. Les gènes impliqués dans l'autophagie susceptibles d'être mutés dans les MICI.

En outre, le surnageant de *Sb* contient des facteurs motogéniques qui accélèrent la restitution intestinale. Cela permettrait l'amélioration de la migration des entérocytes. *Sb* augmente l'affinité de l'intégrine α2β5 pour son ligand le collagène de type I et entre en compétition avec les intégrines αvβ5 pour inhiber l'adhérence sur la vitronectine (Canonici et al., 2011, 2012).

Enfin, la dysfonction de l'autophagie est associée aux MICI et au cancer colorectal. De nombreux gènes ont été identifiés comme des facteurs de risque prédisposant au développement de MICI (tableau 10). L'activation de ce processus est envisagée comme une potentielle voie thérapeutique.

III. L'autophagie

Des études génomiques ont mis en exergue que les mutations des gènes de l'autophagie sont associées à la MC. Seul PTNP2 est associé à la MC et la RCH (Glas et al., 2012). Deux gènes présentent une association étroite avec la MC : ATG16L et NOD2.

ATG16L est essentiel à l'induction de l'autophagie. Comme vu précédemment, Atg5-Atg12 interagit avec Atg16L pour former un complexe protéique de haut poids moléculaire, crucial pour l'élongation de la membrane de l'autophagosome.

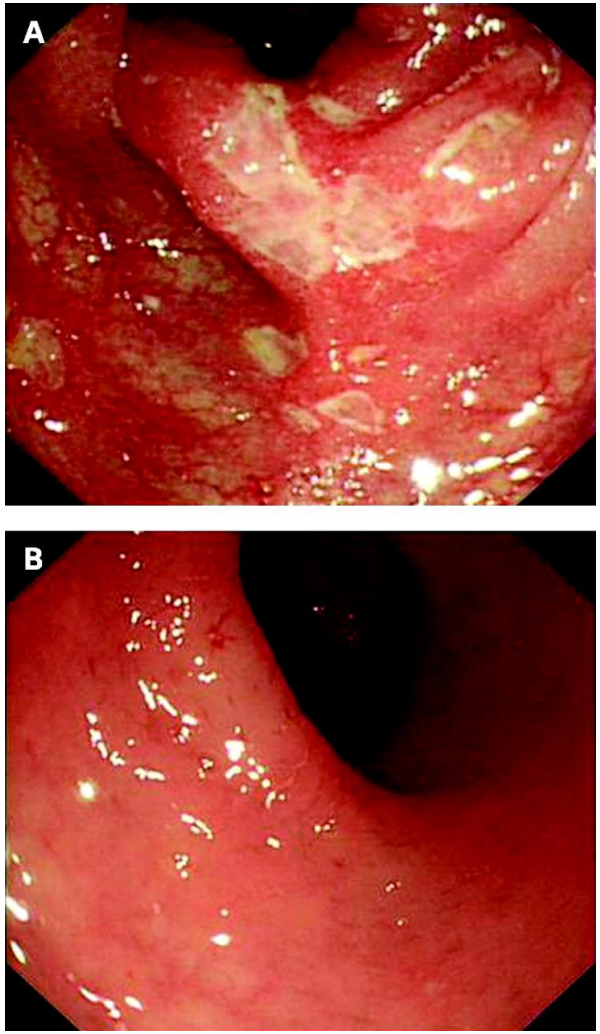
L'importance de Atg16L a été mise en évidence par l'analyse d'échantillons de patients atteints de MC (substitution Thr300A) et d'individus sains, ainsi que l'étude de deux modèles murins : une souris chimérique où les cellules hématopoïétiques de souris ATG16L1 $^{-/-}$ sont implantées dans des souris sauvages irradiées et un modèle de souris conditionnelles (Villin-Cre) pour ATG16L (Randall-Demllo, Chieppa, & ERI, 2013).

Il a été montré qu'Atg16L module la réponse immune des macrophages en diminuant la production d'IL-1β. De plus, Atg16L est responsable de l'homéostasie des cellules de Paneth dont la dé-granulation est anormale dans les modèles murins déficients en ATG16L et chez les patients MC (Cadwell et al., 2008).

Enfin, Kuballa et *al.* ont démontré que la MC est associée à une autophagie défectueuse lors d'une infection bactérienne comme la Salmonelle (Kuballa, Huett, Rioux, Daly, & Xavier, 2008).

NOD1 et NOD2 sont des éléments clés dans l'immunité contre les pathogènes intracellulaires. NOD2 est inclut dans le processus de xénophagie qui permet la dégradation et l'élimination des pathogènes limitant ainsi leur propagation. L'association des variants de NOD2 et de la MC montre l'importance de l'autophagie dans l'immunité innée. Rs2066847 est la mutation la plus répandue de NOD2 chez les patients atteints de la MC (Waterman et al., 2011).

Elle conduit à la synthèse d'une protéine Nod2 tronquée ayant perdue sa fonctionnalité (Duclos et al., 2001). Des études récentes ont mis en exergue que NOD1 et NOD2 sont impliqués dans le recrutement d'Atg16L de la membrane plasmique vers le site d'entrée des bactéries (Travassos et al., 2010). L'association Nod2- Atg16L n'est cependant pas affectée par la mutation d'ATG16L. Ces recherches lient NOD2 et ATG16L, deux gènes identifiés comme des facteurs de risque pour la MC, avec des implications dans l'immunité innée. De



Massey D C O et al. Gut 2008;57:1294-1296

Figure 36. Colostomies avant (A) et après (B) 6 mois de traitement avec de la sirolimus (rapamycine).

Ici est présenté la cas d'une patiente de 37 ans, avec une MC refractaire touchant les zones colonique et périanale. Cette patiente est en échec thérapeutique, elle est traitée à l'IFX. La génomique ayant mis en évidence l'implication des gènes de l'autophagie dans le développement des MICI, il a donc été envisagé de traiter cette patiente avec un inhibiteur de mTORC1 pour activer l'autophagie. La patiente a été traité à l'IFX et à la sirolimus 'rapamycine) pendant 6 mois pour obtenir une dose de 5 ng/ml dans le sang. Après le traitement, l'amélioration macroscopique est correlée avec une diminution du taux de CRP (divisé par 40).

Copyright © BMJ Publishing Group Ltd & British Society of Gastroenterology. All rights reserved.

plus, l'autophagie est un élément clé dans le mécanisme de présentation de l'antigène bactérien aux cellules T.

PTPN2 (*T cell protein tyrosine phosphate non-receptor type 2*) a été récemment identifié comme un facteur de développement des MICI.
Une première mutation est mise en évidence dans une région codante (rs2542151) ; elle est associée à la MC et la RCH. La protéine codée par PTPN2 est un régulateur négatif des cytokines pro-inflammatoires. Les souris KO pour PTPN2 montre un développement défectueux des cellules T et un développement précoce d'une inflammation systémique létale.
Une seconde mutation (rs1893217) découverte dans l'intron 7 est uniquement liée à la MC. Chez les patients MC, l'expression de ptpn2 est accentuée au niveau des muqueuses inflammées. Ces résultats suggèrent que PTPN2 régule négativement l'inflammation. A l'aide de siRNA pour ptpn2 dans des cellules T84 et par l'étude de fibroblastes mutés pour PTPN2 issus de patients MC, il a été mis en évidence que ptpn2 joue un rôle dans la formation de l'autophagosome (Scharl et al., 2012). Cependant, le mécanisme par lequel ptpn2 influence l'autophagie reste flou : il est suggéré que lors de la synthèse d'INFγ et de TNFα, ptpn2 promeut l'autophagie par la répression de mTORC1 et *via* l'activation des voies EGFR et AKT (Scharl & Rogler, 2012).

Il est également possible que les mutations de PTPN2 soient associées à la MC en combinaison avec les mutations de ATG16L et NOD2 conduisant ainsi à la résistance et la propagation des pathogènes intracellulaires et contribuant potentiellement à l'augmentation de l'inflammation chronique (Cadwell et al., 2008, 2010).

L'implication de l'autophagie dans le développement des MICI amène à considérer ce processus comme une nouvelle voie thérapeutique. Il est possible d'inhiber mTORC1 par des molécules pharmacologiques telles que la rapamycine et l'everolimus conduisant ainsi à l'activation des gènes de l'autophagie. Des patients présentant une MC réfractaire aux traitements conventionnels comme l'Inflimax, ont été traités pendant 6 mois à la rapamycine additionnée à l'immunosuppresseur (figure 36). Il a été observé une rémission chez ces patients. Une étude similaire chez des patients RCH conduit à la même observation (Fritz, Niederreiter, Adolph, Blumberg, & Kaser, 2011; García-Mauriño, Alcaide, & Domínguez, 2012).
Cependant, mTORC1 n'est pas seulement impliqué dans le contrôle de l'autophagie, il affecte également la prolifération et la croissance cellulaire mais aussi le métabolisme cellulaire. Par

conséquent, l'induction pharmacologique de l'autophagie par une voie dépendante de mTORC1 peut donc avoir des effets additionnels indésirables.
Le taux d'inositol intracellulaire et inositol-1, 4, 5- triphosphate inhibe l'autophagie par un mécanisme indépendant de mTORC1. L'autophagie peut donc être augmentée par la diminution du taux d'IP3 à l'aide de lithium, de carbamazepine ou d'acide valporique.
In vitro, la combinaison de traitement indépendant et dépendant de la voie mTORC1 a un effet synergique sur l'induction de l'autophagie.

Au vue de la faible observance des thérapies conventionnelles et de leurs effets secondaires importants, il est nécessaire de concevoir une nouvelle approche thérapeutique moins délétère : la voie cholinergique, une sérieuse candidate ?

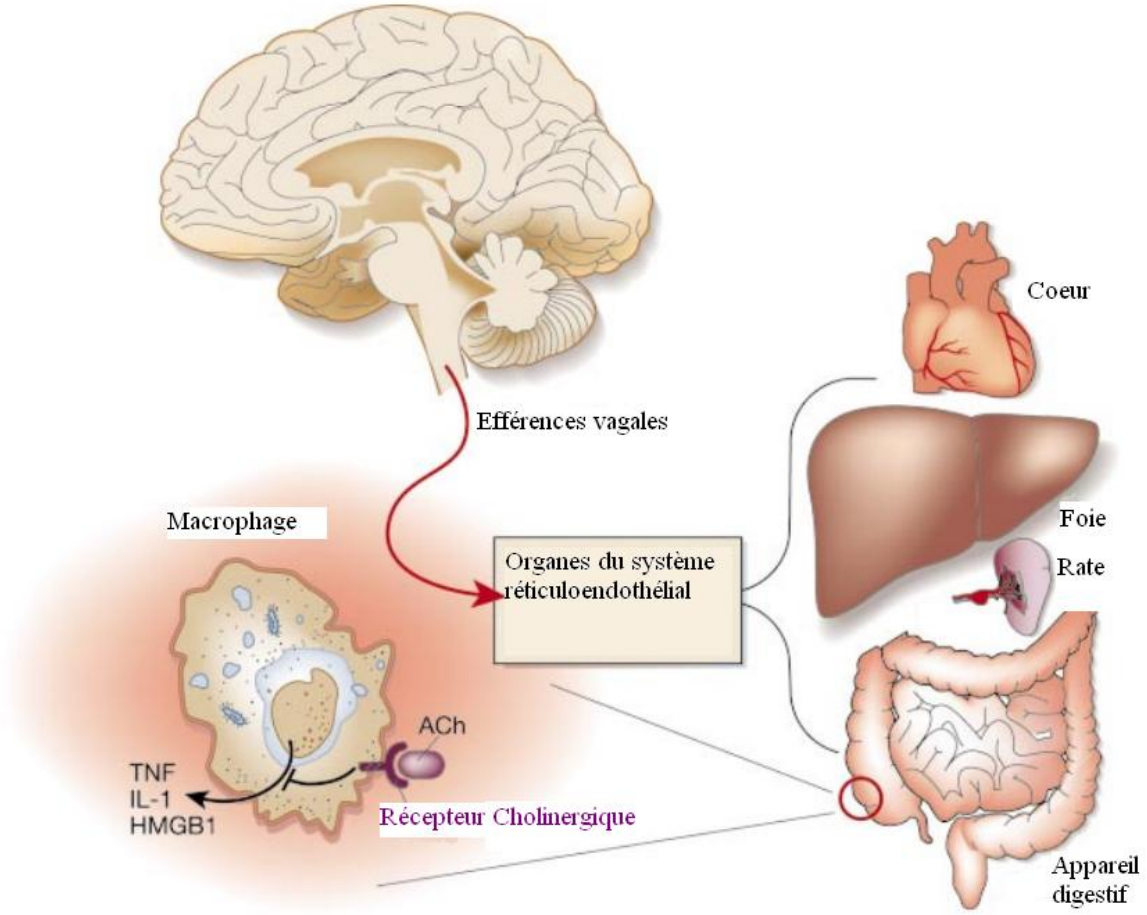


Figure 37. La voie cholinergique anti-inflammatoire.

Les efférences du nerf vague libèrent de l'acétylcholine (ACh) au niveau des organes du système réticuloendothélial comme les cœur, le foie, la rate et le tube digestif. ACh se fixe aux récepteurs cholinergiques portés par les macrophages. Cela induit l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF, IL-1.

D'après Tracey 2002.

IV. La voie cholinergique anti-inflammatoire

Cette voie aux propriétés anti-inflammatoires a été mise en évidence par le groupe de Tracey, au début des années 2000. Elle repose sur l'activation des efférences vagales et la sécrétion d'acétylcholine (ACh) (Tracey, 2002).

La voie cholinergique anti-inflammatoire est activée en réponse à une inflammation. Les afférences vagales transmettent le signal de l'inflammation au niveau du noyau du tractus solitaire, dans le système nerveux central (figure 37). Des potentiels d'action sont alors transmis par les efférences vagales au niveau de la périphérie. Cela induit une sécrétion d'ACh qui va interagir avec les cellules immunitaires dont les macrophages dans les organes lymphoïdes ou sur le site de l'inflammation. En effet, les macrophages portent des récepteurs α7 nicotinique (α7 nAChR), ayant pour ligand l'ACh. L'activation de ces récepteurs conduit à l'inhibition du facteur de transcription NFκB responsable de la transcription de cytokines pro-inflammatoire (TNF-α, IL-1, IL-6). Cette action permet de diminuer l'environnement cytokinique et donc d'obtenir un effet anti-inflammatoire (Pavlov & Tracey, 2005).

L'activité anti-inflammatoire de la voie cholinergique est obtenue par la neurostimulation vagale (NSV) par un stimulateur sous-claviaire. La NSV, ainsi que les acteurs qui la composent seront plus longuement expliqués dans le chapitre IV.

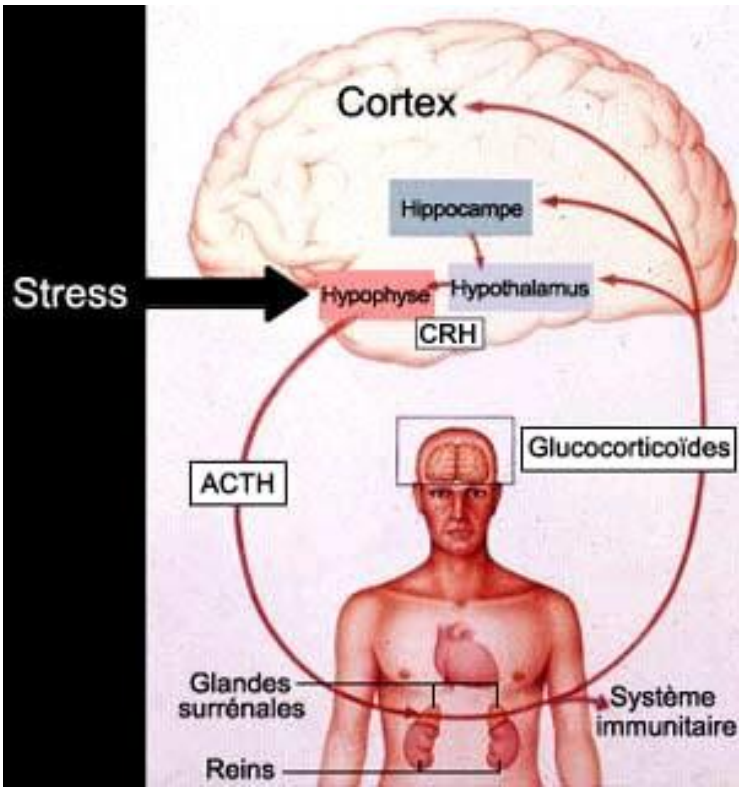


Figure 38. L'axe HPA (HPA : *Hypothalamo pituitary adrenal)*.

En 1955, Geoffrey Harris démontre que le stress induit la sécrétion de l'hormone adrenocorticotrope (ACTH) et la libération d'un facteur hypothalamique nommé cortictropin-releasing factor (CRF) (De Groot & Harris, 1950; Guillemin & Rosenberg, 1955). Ainsi, le stress conduit à la modulation de l'activité du système nerveux autonome (SNA) et à l'activation de l'axe corticotrope (HPA : *Hypothalamo pituitary adrenal)* .
D'après http://lecerveau.mcgill.ca

Chapitre IV. Rôle de la relation brain-gut dans les MICI

Synopsis :

Système CRFergique= système du stress
2 récepteurs membranaires: CRF1 et CRF2, ligands : CRF, Urocortine (Ucn1, Ucn2, Ucn3)
Système impliqué dans la dissociation des jonctions intercellulaires et la perméabilité de l'épithélium intestinale favorisant les poussées inflammatoires
Système pouvant faciliter les mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale tels que la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, la migration et l'invasion

Système cholinergique= récepteur muscarinique et nicotinique
Ligand endogène principal : ACh
Système impliqué dans la NSV utilisée dans la dépression et l'épilepsie
Effet anti-inflammatoire parle récepteur nicotinique α7 (α7 nAChR)porté par les macrophages
La NSV : une stratégie prometteuse dans le traitement des MICI ?

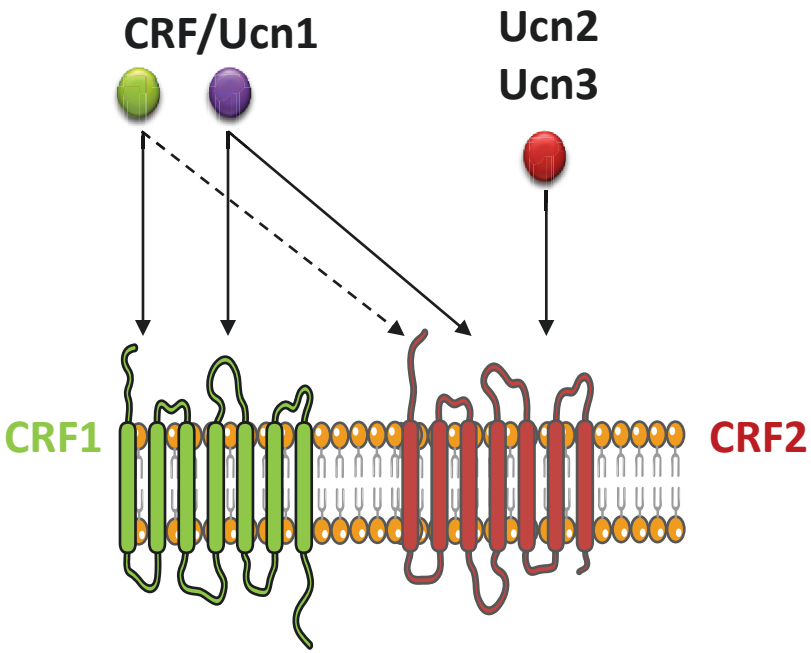
I. Le système CRFergique

Le concept de stress « médical » a été décrit par Hans Selye en se basant sur l'observation de changements macroscopiques comme des lésions gastriques ; l'hypertrophie des glandes surrénales et l'involution des organes lymphatiques chez des rats exposés à différents agents chimiques ou à des contraintes physiques (Selye, 1956, 1976). En effet, en réponse à divers évènements anxiogènes, les organismes vivants ont développé des stratégies d'adaptation pour maintenir leur homéostasie. Le stress est un processus complexe qui fait intervenir les systèmes endocriniens, immunitaires et nerveux. Ces systèmes collaborent pour faire face à une situation de stress en produisant des médiateurs (hormones, cytokines, neuromédiateurs). En 1955, Geoffrey Harris démontre que le stress induit la sécrétion de l'hormone adrenocorticotrope (ACTH) et la libération d'un facteur hypothalamique nommé *corticotropin-releasing factor* (CRF) (De Groot & Harris, 1950; Guillemin & Rosenberg, 1955). Ainsi, le stress conduit à la modulation de l'activité du système nerveux autonome (SNA) et à l'activation de l'axe corticotrope (HPA : *Hypothalamo pituitary adrenal*) (figure 38).

Lorsque le cortex préfrontal perçoit le stress (stress émotionnel) ou que les afférences vagales signalent au cerveau un stress périphérique (i.e. inflammation), l'information est transmise au noyau du tractus solitaire puis au noyau paraventriculaire de l'hypothalamus qui, en libérant le CRF hypothalamique va favoriser la libération d'ACTH hypophysaire pour la libération d'adrénaline/noradrénaline (A/NA) et de glucocorticoïdes (GC) au niveau des glandes médullo et cortico-surénales respectivement. Les GC inhibent l'activité du système immunitaire et régulent l'activation de l'axe HPA par un rétrocontrôle négatif ce qui inhibe la transcription du CRF (Chrousos, 1995; Vale, Spiess, Rivier, & Rivier, 1981).

On distingue les stress « cognitifs », c'est-à-dire reconnus directement par le SNC (évènements psychiques, émotions) des stress « non cognitifs » (traumatismes et blessures physiques, infections et inflammations). De plus des stress « non cognitifs » auront un retentissement sur le système nerveux qui peut s'exprimer sous forme psychique. Les effets du stress vont être très différents en fonction de sa durée, de sa répétition, de son intensité et de sa qualité. On distinguera ainsi le stress « aigu » du stress « chronique ». L'influence des stress psychologiques et environnementaux sur la prise alimentaire (Stengel & Taché, 2014), la fatigue, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type II font l'objet d'un intérêt croissant (Miller, Chen, & Cole, 2009). Le stress conduit également à une perturbation de l'homéostasie de la barrière épithéliale cutanée ou intestinale induisant respectivement une aggravation des maladies de peau comme l'eczéma ou le psoriasis (Arck, Slominski, Theoharides, Peters, & Paus, 2006) et des troubles gastro-intestinaux tels que les MICI et le syndrome de l'intestin irritable (Chang et al., 2011). Le système CRFergique est un élément central des altérations induites par le stress. Cette neuro-hormone a initialement été décrite comme étant synthétisée au niveau du SNC et libérée en périphérie, mais on sait maintenant qu'elle peut également être produite en périphérie et ainsi avoir une action paracrine et autocrine (Larauche et al., 2009).L'expression des récepteurs au CRF et de leurs ligands a été décrite au niveau du tube digestif (Buckinx et al., 2011), mais les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'ils impliquent sont mal connus et plutôt focalisés sur le SNE et ses interactions avec le système immunitaire digestif (Kiank et al., 2010). A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la fonction des récepteurs au CRF exprimés par les cellules épithéliales intestinales.

Dans cette partie, le système CRFergique, ses composants (récepteurs et ligands) ainsi que sa distribution et son implication dans les MICI et les CCR vous seront présentés (pour revue (Ducarouge & Jacquier-sarlin, 2011)).



CRF: Corticotropin-releasing factor
Ucn : Urocortine

Figure 39. Le système CRFergique.

Le CRF et l'UCn1 avtivent le CRF1 et le CRF2 avec une plus faible affinité. Tandis que l'Ucn2 et 3 s'associent exclusivement avec le CRF2. Une fois activé les récepteurs sont endocytés puis dégradés ou recyclés à la membrane plasmique.

1) Les ligands : CRF et urocortines (Ucn)

Le CRF a été identifié en 1981, c'est un peptide hypothalamique de 41 acides aminés (aa) stimulant la libération d'ACTH et de β-endorphine depuis la partie antérieur de la glande pituitaire (vale 1981). D'autres membres de la famille du CRF ont été également découverts :
i) Ucn1, un peptide de 40 aa présentant 45% d'homologie avec le CRF
ii) Ucn2, un peptide de 39 aa partageant 42% d'homologie avec le CRF
iii) Ucn3, un peptide 38 aa possédant respectivement 21 et 26% d'homologie avec l'Ucn1 et le CRF. Ces quatre peptides sont codés par des gènes distincts hautement conservés entre les mammifères ainsi que les non-mammifères et les invertébrés (Lovejoy & de Lannoy, 2013).

Le CRF et les peptides associés ont tout d'abord été décrits dans le système nerveux central. Cependant, ils sont également détectés dans les organes viscéraux comme les poumons, le coeur, la rate, le tissus adipeux, les gonades (Boorse & Denver, 2006; Wypior, Jeschke, Kurpisz, & Szekeres-Bartho, 2011), le pancréas (C. Li et al., 2003; van der Meulen et al., 2012) et le tractus intestinal (Kozicz & Arimura, 2002; Y Taché & Perdue, 2004; Yvette Taché & Bonaz, 2007; Pu-Qing Yuan, Wu, & Taché, 2012) incluant le système nerveux entérique (Kimura et al., 2007; Liu et al., 2006).
Le CRF est présent dans la muqueuse intestinale au niveau des monocytes de la *lamina propria* et dans les cellules épithéliales (Kawahito et al., 1994, 1995) tandis que l'Ucn1 est observé dans les macrophages de la *lamina propria* et faiblement dans les cellules entérochromaffines (Bhatia & Tandon, 2005; Muramatsu et al., 2000; Saruta et al., 2004). L'Ucn3 est plus largement distribué : ce ligand est observé dans les muscles lisses, l'endothélium, les cellules enterochromaffines et le SNE (Hsu, 2004; Saruta et al., 2005).
Les ligands CRF et Ucns présentent des affinités différentes pour les récepteurs au CRF (CRF1 et CRF2) (Hauger et al., 2003; Hillhouse & Grammatopoulos, 2006; Lewis et al., 2001). Bien que le CRF reconnaisse les deux récepteurs, il présente une affinité 4 à 10 fois plus importante pour le récepteur CRF1 (Grace 2007). L'Ucn1 active les 2 récepteurs avec la même affinité tandis que l'Ucn2 et l'Ucn3 fixent le CRF2 de manière exclusive (Dautzenberg & Hauger, 2002; Grace et al., 2007) (figure 39).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacent à la libération de CRF/Ucn restent encore à élucider. Jusqu'à présent, les études se sont concentrées sur le CRF libéré par le SNE et les cellules immunitaires au niveau du tube digestif. La proximité entre ces différents

acteurs dans la muqueuse pourrait conduire à l'activation du système CRFergique périphérique et altérer l'homéostasie de la muqueuse. Dans ce sens, l'équipe de Wallon a montré que l'activation des récepteurs muscariniques (par l'ACh) au niveau des éosinophiles de la muqueuse libèrent du CRF qui, à son tour, active les mastocytes et conduit à l'altération de la barrière épithéliale dans le côlon de patients atteints de RCH et dans le modèle épithélial intestinal de cellules T84 (Wallon et al., 2011).

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

2) Expression et localisation des récepteurs CRFergiques

a) Expression

L'effet du CRF et des Ucns s'exercent par le biais de deux récepteurs de classe II à sept fragments transmembranaires couplés aux protéines G : le CRF1 (415 aa) (R. Chen, Lewis, Perrin, & Vale, 1993) et le CRF2 (411 aa) (Lovenberg et al., 1995).
Au niveau de l'extrémité N-terminale (extracellulaire), les récepteurs au CRF possèdent 5 sites de N-glycosylation et des résidus cystéine permettant la formation de ponts disulfures impliqués dans la reconnaissance des ligands (Liapakis, Venihaki, Margioris, Grigoriadis, & Gkountelias, 2011; Zmijewski & Slominski, 2010). Or l'inflammation influence le statut de glycosylation de certains récepteurs permettant ainsi de réguler l'activation de ce système (Groux-Degroote et al., 2008).

L'épissage alternatif des gènes de CRF génèrent plusieurs isoformes de CRF1 et CRF2 (Pisarchik & Slominski, 2001; Zmijewski & Slominski, 2010) :

- Il existe 9 isoformes de CRF1 nommées $CRF1_{a-i}$. $CRF1_a$ étant le récepteur fonctionnel majeur. $CRF1_b$ ou pro-CRF1 est l'unique récepteur codé par les 14 exons du gène du CRF, il présente une insertion de 29 aa dans la première boucle intracellulaire comparé à $CRF1_a$

(Markovic & Grammatopoulos, 2010). Les isoformes $CRF1_{c-i}$ présentent toutes au moins l'épissage de l'exon 6. $CRF1_i$ est la dernière isoforme fonctionnelle décrite, elle correspond à l'épissage de l'exon 4. Peu de choses sont connues quant à leur expression protéique, leur distribution et leur fonctionnalité selon les différents tissus. Les $CRF1_{b, c, d, f}$ présentent une faible affinité pour leur ligand et sont incapables d'induire une signalisation intracellulaire. Ces isoformes pourraient exercer une fonction de régulation en titrant les ligands et les rendant moins disponibles pour les récepteurs fonctionnels.

- Il existe 3 isoformes de CRF2 chez l'homme : $CRF2_a$, $CRF2_b$ et $CRF2_c$ (originairement nommées $CRF2_\alpha$, $CRF2_\beta$, $CRF2_\gamma$). Chez les mammifères, seuls deux variants $CRF2_a$ et $CRF2_b$ sont exprimés (Hauger et al., 2003; Hillhouse & Grammatopoulos, 2006). Ces isoformes diffèrent par la structure de leur extrémité N-terminale extracellulaire (Hauger et al., 2003). Les domaines N-terminaux de $CRF2_a$, $CRF2_b$ et $CRF2_c$ sont composés respectivement de 34 aa, 61 aa et 20 aa alors que leur fragment C-terminal est identique (Dautzenberg, Higelin, Wille, & Brauns, 2004; Miyata, Shiota, Chaki, Okuyama, & Inagami, 2001). Le $CRF2_a$ présente 94% d'homologie entre la souris et l'homme (Dautzenberg et al., 2004). Des formes tronquées et solubles du récepteur ont également été décrites. Elles pourraient réguler l'activité du CRF2 membranaire par compétition avec les ligands (A. M. Chen et al., 2005). On note une différence de poids moléculaire des isoformes selon les tissus, les espèces, les lignées cellulaires. Ces variations sont attribuées aux différences d'épissage, au clivage du récepteur et au statut de glycosylation (Grigoriadis & De Souza, 1989; Spiess et al., 1998).

b) Distribution

Dans le SNC, le CRF1 est largement distribué. Chez le rat, ce récepteur est retrouvé dans le cerveau antérieur, la région septale et amygdalienne (Justice, Yuan, Sawchenko, & Vale, 2008). Au niveau de l'hypothalamus son expression est plus faible, elle sera régulée dans des conditions de stress (Bonaz & Rivest, 1998; Imaki et al., 2001; Konishi, Kasagi, Katsumata, Minami, & Imaki, 2003).

Le CRF2 est présent au niveau du septum latéral, de l'amygdale, du noyau hypothalamique, du raphé dorsal et du noyau du tractus solitaire (Bittencourt & Sawchenko, 2000).

A la périphérie, CRF1 est détecté dans les lobes antérieurs et intermédiaires de la glande pituitaire (Turnbull & Rivier, 1997) et au niveau du tube digestif plus particulièrement dans

Intestin grêle	**Récepteurs**		**Ligands**			
Épithélium	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
	s	h-s-r	s-r	r	h-s-r	h
Enterocyte						
Goblet						
Endocrine		r	r			
Paneth			r			
Lamina propria	s	h-r	s-r		r	
Macrophage	h	h-s-r				
Mastocyte		h-r				
Système nerveux entérique	c-r	c-r	c-r	r	r	
Vasculaire					r	
Muscles lisses	r	r				

Tableau 11. Distribution du système CRFergique dans l'intestin grêle.
s: souris, r: rat, h: humain, c: cochon d'inde

les cellules endocrines, neuronales et immunitaires (Chatzaki et al., 2004; P-Q Yuan, Million, Wu, Rivier, & Taché, 2007).

Tandis que le CRF2 est trouvé dans l'estomac, au niveau des cryptes et des vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse intestinale (Chatzaki et al., 2004; Pu-Qing Yuan et al., 2012) et dans la muqueuse intestinale au niveau des cellules de Paneth, des cellules endocrines, des cellules immunitaires mais également au niveau des entérocytes. La distribution des récepteurs CRFergiques au niveau de la muqueuse intestinale est précisée dans les tableaux 11 et 12.

La distribution et l'expression des différents acteurs du système CRFergique vont être moduler dans les conditions de stress, d'inflammation ou des cancers (Ducarouge & Jacquier-sarlin, 2011).

3) Les voies de signalisation activées par le système CRFergique

Les récepteurs au CRF induisent un grand nombre de signaux intracellulaire tels que les protéines kinases A, B, C et les MAPK p42/44 (ERK1/2) et p38, NOS, Fas, NFκb ou le flux calcique (Grammatopoulos & Chrousos, 2002). La voie de signalisation sollicitée dépend du sous-type de la protéine Gα associée au récepteur du CRF. Ainsi, ces récepteurs sont principalement couplés à la sous-unité Gαs qui active l'adényle cyclase et produit de l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc) (F. M. Chen, Bilezikjian, Perrin, Rivier, & Vale, 1986). Lorsqu'ils sont associés aux sous-unités telles que Gαq, i, o ou z, ils activent des voies de signalisation telles que la phospholipase C (PLC) ou PI3K/AKT alors que l'association des récepteurs au CRF avec Gβγ amène à l'augmentation du flux calcique (Gutknecht, Vauquelin, & Dautzenberg, 2010; Karteris, Grammatopoulos, Randeva, & Hillhouse, 2000).

Une voie indépendante des protéines G a été également mise en évidence ; elle met en jeu la protéine kinase src. Cette kinase interagit avec les récepteurs au CRF lorsqu'ils sont endocytés et elle participe à l'activation de ERK (Van Kolen et al., 2010).

Après stimulation, les récepteurs au CRF sont régulés par des mécanismes de désensibilisation. Le recrutement de GRK3 et 6 (*G protein coupled-receptor kinase*) conduit à la phosphorylation du domaine c-terminal du récepteur au CRF ainsi qu'au recrutement de la β-arrestine (Teli, Markovic, Levine, Hillhouse, & Grammatopoulos, 2005). Cela entraine

Côlon	**Récepteurs**		**Ligands**			
Épithélium	CRF1	CRF2	CRF	Ucn1	Ucn2	Ucn3
	s-o-r	h-r	h-r	h	h-s-r	h
Enterocyte		h				
Goblet	h-o-r					
Endocrine			h-r			h
Lamina propria	h-o-r	h-o-r		r	r	h
Macrophage	h	h-r	h	h		
Mastocyte	h	h-r	h			
Système nerveux entérique	c-h-o-r	c-h-o-r	c-r	h-r	r	h
Vasculaire		h-r		h	s-r	h
Muscles lisses	o	o			r	h

Tableau 12. Distribution du système CRFergique dans l'intestin grêle.
s: souris, r: rat, h: humain, o: ovin, c: cochon d'inde

l'endocytose des récepteurs au CRF qui peuvent alors être recyclés à la membrane ou dégradés par la voie endo-lysosomale. Les différences entre le CRF1 et le CRF2 se situent au niveau de la cinétique de désensibilisation, laquelle varie selon le modèle cellulaire étudié (Markovic et al., 2008; Rasmussen et al., 2004).

4) Rôle du système CRFergique dans la l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Lors de la dernière décennie, les recherches ont permis une avancée dans les connaissances de l'expression périphérique et de la régulation du système CRFergique ainsi que dans son implication dans l'homéostasie et les pathologies intestinales (Buckinx, Adriaensen, Nassauw, & Timmermans, 2011; Díaz & Smani, 2013; Onorati et al., 2013; Overman, Rivier, & Moeser, 2012; P-Q Yuan, Wu, Wang, & Taché, 2010).

a) Le système CRFergique lors d'un stress

Chez les rongeurs, les stress physiques ou psychiques aigus ou chroniques engendrent des dysfonctionnements de la barrière épithéliale en augmentent la perméabilité para- et trans-cellulaire du côlon (Frederick Barreau et al., 2007; Heather L Cameron & Perdue, 2005; Gareau, Silva, & Perdue, 2008; Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002; Teitelbaum, Gareau, Jury, Yang, & Perdue, 2008). Cette altération semble dépendante de CRF1 et CRF2 et augmente la susceptibilité de développer un épisode inflammatoire (Larauche et al., 2009). Par ailleurs, des différences inter-individuelles de l'expression des composants du système CRFergique peuvent également expliquer certaines susceptibilités au stress. Dans ce sens, les deux souches de rat Sprague Dawley et Wistar Kyoto qui présentent une sensibilité différente à l'anxiété montrent également des profils d'expression différents du système CRFergique, en conditions basales et en réponse au stress (o'malley et al., 2010b).

i. Le système CRFergique lors d'un stress aigu

Les effets du *stress aigu* sur la barrière épithéliale sont mineurs par rapport au ***stress chronique***: d'une part parce qu'il induit *via* la production de CRF, la libération de mucine par

les cellules caliciformes possédant les récepteurs CRF1 qui pourrait constituer un mécanisme de protection de l'épithélium. Ce processus n'est pas maintenu dans les stress chroniques. D'autre part, l'altération générée par un stress aigu ne dépasse pas 5 jours, soit le temps du renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal. Cependant le stress aigu provoqué par des stimuli acoustiques conduit à l'augmentation de la perméabilité du côlon due à la dégranulation des mastocytes, la sur-production d'INFγ (Castagliuolo et al., 1996; Lakshmanan et al., 2008; Santos et al., 1999; Santos et al., 2008). Dans ces expériences, la barrière épithéliale colique est morphologiquement altérée, l'expression des ARNm codants pour les protéines des JS est réduite et la différenciation des côlonocytes est modifiée (Demaude et al., 2006). Ces changements transitoires de phénotypes des côlonocytes sont également observés suite à l'activation des mastocytes et la libération d'INFγ (Ferrier et al., 2003). L'exposition à un stress chronique d'évitement de l'eau occasionne des défauts de la barrière et des anomalies ultrastructurales de la muqueuse plus sévères et plus durables (Santos et al., 2001; Soderholm et al., 2002).

ii. Le système CRFergique lors d'un stress chronique

Le *stress chronique* (5-15 jours) est plus révélateur des conditions anxiogènes répétées subies par l'homme au quotidien. Il a des conséquences plus dramatiques sur la structure de l'épithélium intestinal.

Chez le rat, la chronicité du stress conduit à la réduction des longueurs des cryptes (par l'augmentation de l'apoptose) et à l'augmentation de la prolifération cellulaire pour tenter de remplacer les cellules endommagées ainsi qu'à la diminution de la différenciation cellulaire. La présence de cellules non-différenciées au sein de l'épithélium peut être responsable du défaut de perméabilité de la barrière épithéliale (Boudry, Jury, Yang, & Perdue, 2007).

La séparation maternelle (stress précoce et chronique) chez les ratons provoque une altération de la différenciation des cellules épithéliales intestinales dans le duodénum conduisant à l'appauvrissement en cellules sécrétrices (de Paneth et Goblet) et à une hyperplasie des cellules endocrines dépendant respectivement de CRF2 et CRF1. Cette perte de cellules conduit d'une part à une diminution de sécrétion de mucus augmentant l'exposition de l'épithélium intestinal aux lésions mécaniques (par le chyme) et aux agressions bactériennes. D'autre part, cela induit une altération de la libération de défensines favorisant la prolifération bactérienne.

De la même manière que pour la séparation maternelle, l'administration chronique de CRF chez le rat conduit à une augmentation du nombre de cellules entérochromaffines, tandis que l'administration d'Ucn2 diminue le nombre de cellules de Paneth et de Goblet (Estienne et al., 2010). L'effet généré sur les cellules de Paneth et de Goblet ne dépasse pas la durée du renouvellement de la population cellulaire de l'épithélium contrairement aux cellules entéroendocrines. Ces éléments suggèrent que pour induire un effet à long terme, le CRF1 affecte nécessairement les cellules souches.
Par ailleurs, dans le côlon de rat, les récepteurs au CRF sont tous les deux exprimés dans le tiers basal des cryptes et pourraient ainsi affecter la différenciation cellulaire (Chatzaki et al., 2004).

b) Le système CRFergique et l'altération de la barrière épithéliale

Différents mécanismes sont responsables des dysfonctions de la barrière épithéliale induites par le système CRFergique qui pourrait agir *via* le système nerveux, les cellules immunitaires et les cellules épithéliales.

i. Rôle de l'acétylcholine (ACh)

La souche de rats susceptibles au stress Wistar-Kyoto a une activité d'acétylcholine transférase diminuée dans les homogénats de muqueuses par rapport à la souche parentale qui est moins susceptible au stress, ce qui suggère que l'ACh pourrait contribuer à la susceptibilité au stress (Saunders et al., 1997).
Par ailleurs l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques (mAChR) empêche à la fois l'augmentation de la libération de mucines (Castagliuolo et al., 1996) et la perméabilité trans-cellulaire (Kiliaan et al., 1998; Santos et al., 1999) induite par l'exposition à un stress de contention.
Lors d'une séparation maternelle, l'activation de CRF2 au niveau du SNE conduit à la libération d'ACh. La stimulation des mAChR présents sur les cellules épithéliales conduit à l'augmentation de la perméabilité intestinale (Gareau et al., 2007, Pélissier-Rota et al, 2013). Lors d'un stress aigu, l'ACh provoque également une altération de l'épithélium par la sécrétion enzymatique pancréatique comme la trypsine suite à l'activation de PAR2 (Demaude et al., 2009).

ii. Rôle des mastocytes

Les animaux dépourvus de mastocytes ne présentent pas de troubles gastro-intestinaux après un épisode stressant (Santos, Yang, Söderholm, Benjamin, & Perdue, 2001; Söderholm et al., 2002).

Plusieurs études montrent que suite à un stress, l'activation des mastocytes et la dégranulation de médiateurs comme les prostaglandines, des protéases et l'histamine dans la *lamina propria* peuvent conduire à des altérations de l'épithélium digestif et à des anomalies de la perméabilité para- et trans-cellulaire (Kiliaan et al., 1998; Saunders et al., 1994). Ces effets qui dépendent du CRF sont bloqués par le doxantrazole, un stabilisateur des mastocytes (Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002). Les médiateurs libérés peuvent affecter la perméabilité épithéliale directement comme la tryptase en agissant sur l'activation des récepteurs PAR2 (Cenac et al., 2004; Jacob et al., 2005) ou indirectement :

i) en stimulant le système immunitaire local (Ferrier et al., 2003) ;

ii) en réduisant la libération de mucus (Pfeiffer 2001) ;

iii) en diminuant l'expression des protéines des jonctions intercellulaires comme l'occludine et ZO-1 dans les entérocytes (Scudamore, Jepson, Hirst, & Miller, 1998).

Lors d'un stress chronique (comme la séparation maternelle), les mastocytes produisent par le biais de CRF1 du *nerve growth factor* suivi d'une hausse de la perméabilité para-cellulaire (F Barreau, Ferrier, Fioramonti, & Bueno, 2004; Frederick Barreau et al., 2007; Leon et al., 1994).

iii. Signalisation au niveau des entérocytes

Dans la lignée cellulaire de rat IEC, l'activation des récepteurs au CRF induit la dissociation des contacts cellulaires *via* l'AMPc (Boucher, Laprise, & Rivard, 2005).

Des études récentes ont mis en exergue le couplage des récepteurs CRF avec la kinase src qui est impliquée dans la régulation des jonctions intercellulaires. L'activation de CRF1 et/ou CRF2 pourrait favoriser l'activation de src par auto-phosphorylation sur le résidu tyrosine 418.

Src activée permettrait la phosphorylation de la E-cadhérine et de p120ctn déstabilisant les jonctions adhérentes (Ireton et al., 2002) ainsi que la mono-ubiquitinylation de la E-cadhérine (induisant sa dégradation par le protéasome) (Y. Fujita et al., 2002). Ces résultats sont corroborés par nos observations indiquant que l'activation de CRF2 par l'Ucn3 dans les

cellules HT-29 induit une dissociation des contacts intercellulaires avec une endocytose de la E-cadhérine et une translocation nucléaire des caténines (Ducarouge et al., 2013).
Chez le rat, le stress de contention, les injections intra-veineuses ou intra-cérébro-ventriculaire de CRF conduisent à une augmentation de l'ARNm de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) et la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE_2) au niveau de la muqueuse du côlon (Castagliuolo et al., 1996; Pothoulakis, Castagliuolo, & Leeman, 1998).L'activation de COX-2 dépendant de RhoA déstabilise les JA (Ho & Chang, 2006). Tandis que la signalisation du PGE2 induit quant à elle la dissociation des jonctions serrées par un mécanisme qui implique la PKC et la Claudine 1 dans la lignée de cellules Caco2 (Tanaka et al., 2008).

Ainsi, l'activation périphérique des récepteurs du CRF induite par le stress conduit au dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale par l'engagement du SNE, des mastocytes, et des cellules épithéliales. Le stress n'est pas immanquablement un facteur déclencheur de l'inflammation, il induit l'altération de l'épithélium intestinal (Collins, 2001). Cependant la mise en contact du contenu de la lumière intestinale avec les cellules immunitaires de la muqueuse permis par l'altération de l'épithélium favorise l'inflammation. Ainsi, le stress facilite les poussées inflammatoires chez les patients atteints de MICI.

c) Le système CRFergique et l'inflammation

i. Inflammation et régulation du système CRFergique

Le stress précoce a une part non négligeable dans l'étiologie des MICI puisqu'il impacte à long terme la physiologie épithéliale en modifiant sa composition en terme de répartition des différents types de cellules et de leurs interactions.
De nombreux patients atteints de MICI ont vécu un épisode traumatisant durant leur enfance comme des agressions, des abus sexuels, des changements de structure familiale (Heitkemper, Cain, Burr, Jun, & Jarrett, 2011; Walker, Gelfand, Gelfand, & Katon, 1995). Les épisodes de stress peuvent également initier ou aggraver les poussées inflammatoires chez les patients MICI et dans les modèles de colite animaux (Collins, 2001; Mawdsley & Rampton, 2006; Melgar, Engström, Jägervall, & Martinez, 2008; Qiu, Vallance, Blennerhassett, & Collins, 1999).
L'expression des molécules impliquées dans la signalisation du système CRFergique est augmentée lors des poussées inflammatoires : l'expression de l'Ucn2 et du CRF2 a été

identifiée au niveau des cellules du côlon des patients RCH et MC (Moss et al., 2007). L'expression des ligands est corrélée à l'intensité des poussées inflammatoires chez les patients RCH (Saruta et al., 2004).
Dans le modèle de colite induite au TNBS chez le rat, l'expression du CRF2 est diminuée dans les neurones myentériques et les macrophages durant la phase précoce de l'inflammation (jours 1-3). A l'inverse, l'ARNm de l'Ucn2 est augmenté dans les stades précoce et tardif de l'inflammation (12-15 jours) (Chang et al., 2007).

De manière intéressante, l'Ucn1 est absent dans les fœtus ou chez les nouveau-nés. Il apparaît ensuite dans les cellules inflammatoires de la *lamina propria* chez le jeune enfant et augmente chez les adultes. L'apport alimentaire et l'exposition aux agents bactériens après la naissance pourraient contribuer à la régulation de l'expression de l'Ucn1 dans la muqueuse (Muramatsu et al., 2000).

La flore intestinale est impliquée dans le développement de la colite (Elson et al., 1995) et son implication a été suggérée dans la régulation du système CRFergique au niveau de la muqueuse. Cette hypothèse a été testée par injection de LPS chez les rats : l'ARNm et la protéine du CRF sont augmentés dans les cellules inflammatoires, les cellules mésenchymateuses et les plexus myentériques (van Tol et al., 1996; Yuan et al., 2010a).
Les bactéries commensales sont bénéfiques et/ou pathogènes selon la souche, l'environnement et leur localisation. Les patients atteints de MICI, qui subissent des colites de manière chroniques, présentent une composition de la flore gastro-intestinale modifiée (Backhed et al., 2005). Celle-ci pourrait affecter l'expression basale de composés du système CRF selon les sections intestinales et par conséquent augmenter la susceptibilité de déclencher une colite. Les TLRs, qui sont les cibles du LPS, participent à la translocation bactérienne au niveau de la *lamina propria* par une voie trans-cellulaire. Le TLR4 est fortement exprimé dans le côlon et pourrait alors relayer l'augmentation de l'expression du CRF et de l'Ucn1 en participant au développement de l'inflammation (Biswas et al., 2011). L'expression du TLR4 est également augmentée dans les macrophages et les cellules épithéliales intestinales de patients atteints de MC et pourrait favoriser la sensibilité bactérienne retrouvée dans cette pathologie (Cario and Podolsky, 2000).
L'inflammation induite par *Clostridium difficile* toxine A au niveau de l'iléon chez la souris conduit à l'augmentation de l'expression des divers ligands du système CRFergique (excepté

Ucn1) dans les cellules de la *lamina propria* et les cellules épithéliales (Wlk et al., 2002; Kokkotou et al., 2006).

Alternativement, l'inflammation de la muqueuse peut être considérée sur le plan des cellules immunitaires où une activation inappropriée conduit à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et participe au déclenchement des poussées inflammatoires dans les MICI.

Le système CRFergique pourrait être régulé par des cytokines inflammatoires comme l'IL1, l'IL6 ou le TNFα qui sont exprimés de façon différentielle selon les stades de la colite et les différentes MICI (Yuan et al., 2010a).
Cela a été étudié à différentes phases de colite induite par le TNBS chez le rat (Chang et al., 2011; Chang et al., 2007). Au jour 1, durant l'étape précoce de l'inflammation, l'augmentation d'expression de l'Ucn2 dans les macrophages de la muqueuse correspond au pic de production de la myéloperoxydase (marqueur de l'inflammation) alors que l'Ucn1 et le CRF2 sont régulés à la baisse. Au jour 6, durant l'étape tardive de l'inflammation, l'Ucn1 et l'Ucn2 sont à leur niveau maximal au moment du pic de production de TNFα.

Le profil cytokinique retrouvé durant les poussées inflammatoires est différent chez les patients atteints de RCH par rapport aux patients atteints de MC (Fina and Pallone, 2008) et dans les modèles expérimentaux correspondants (Shi et al., 2011). Cette divergence pourrait rendre compte des différences de populations immunitaires activées et les profils de régulation du système CRFergique dans ces pathologies.

ii. Rôle du système CRFergique dans la régulation de l'épithélium

Pour comprendre le rôle du système CRFergique dans la régulation de l'homéostasie intestinale, certaines approches ont été développées basées sur l'inhibition des ligands ou des récepteurs par leur extinction génétique ou pharmacologique. Des injections locales de shRNA ciblant les récepteurs au CRF diminuent les colites induites par le TNBS. Ceci suggère que les deux récepteurs participent aux processus inflammatoires (Chang et al., 2011).
Cependant, certains résultats sont contradictoires selon le type d'inflammation. Par exemple, le KO du CRF2 est responsable d'une diminution de l'inflammation induite par *Clostridium*

difficile toxine A (Kokkotou et al., 2006) mais d'une augmentation de l'inflammation dans un modèle de colite induite par le DSS (Im et al., 2010).
Le fait, que les KO ne soient pas conditionnels, l'altération du système CRFergique central impliqué dans la modulation de l'anxiété, la dépression ou l'activation de l'axe HPA constituent un biais important dans le cadre d'un suivi de l'inflammation chez ces animaux.
Le rôle pro-inflammatoire du CRF2 a également été démontré au niveau cellulaire puisque dans les cellules NCM460, l'activation du CRF2 par l'Ucn2 induit l'accumulation nucléaire de NFκB et la libération d'IL8 et de MCP-1 (Kokkotou et al., 2006; Moss et al., 2007). Dans ces cellules, l'Ucn2 induit aussi l'activation de MAPK qui participe aux processus de différenciation cellulaire, de survie et d'apoptose et peut ainsi modifier l'équilibre prolifération/différenciation/apoptose de l'axe crypto-villositaire.

Dans le modèle expérimental d'inflammation induite par *Clostridium difficile* toxine A chez la souris, les animaux KO CRF développent une inflammation moins sévère (Anton et al., 2004). Dans une colite induite par le TNBS, le KO du CRF est responsable d'une réduction de l'inflammation et de la production d'IL1β local par rapport aux souris issues de la souche parentale (Gay et al., 2008).
Chez le rat, l'extinction de l'ARNm du CRF mais pas celle de l'Ucn2 abroge à la fois la réponse inflammatoire et l'augmentation de l'expression du CRF1 dans les tissus inflammés (la Fleur et al., 2005), suggérant un rôle important du CRF1 dans l'effet pro-inflammatoire du CRF.

D'ailleurs l'administration d'Antalarmine (antagoniste du CRF1) inhibe l'inflammation locale induite par le CRF (Webster et al., 2002). L'effet pro-inflammatoire du CRF pourrait résulter d'une régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires et de neuropeptides. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les ligands du système CRFergique augmentent la production de TNFα, IL1 et IL6 dans les macrophages de souris ayant subies une exposition au LPS.

Les effets pro-inflammatoires du CRF contrastent avec les propriétés anti-inflammatoires rapportées pour l'Ucn1 qui se lient avec une affinité plus élevée sur les mêmes récepteurs. Le traitement avec de l'Ucn1 d'animaux endotoxémiques entraîne une réduction de la libération de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et une augmentation des niveaux d'IL10, interleukine aux propriétés anti-inflammatoires (Gonzalez-Rey et al., 2006a). Dans le modèle de colite induite au TNBS, l'Ucn1 induit un profil de cytokines anti-inflammatoires en faveur

de la réponse des cellules T_{reg} et réduit l'immunité de type Th1 (Gonzalez-Rey et al., 2006b). Les résultats opposés obtenus entre le CRF et l'Ucn1 peuvent être attribués à leurs distributions différentes dans la muqueuse intestinale, mais elle peut aussi varier en fonction du temps et de la dose de ligands. Pendant la phase précoce de l'inflammation, le CRF, l'Ucn1 et l'Ucn2 peuvent transitoirement inhiber la libération de TNFα induite par le LPS dans les macrophages, *via* l'induction d'une voie Cox-2/PGE_2. Cependant, ils augmentent la transcription et la libération de TNFα dans les stades tardifs de l'inflammation (Tsatsanis et al., 2007). Ces auteurs ont également montré que l'activation du CRF2 par une faible dose de ligands augmente l'apoptose des macrophages et favorise ainsi une réponse anti-inflammatoire (Tsatsanis et al., 2005).

Chez l'homme, il a été établi que l'activité sécrétrice des cellules de Paneth exerce un effet protecteur qui est altéré chez les patients atteints de MICI (Aldhous et al., 2009; Wehkamp and Stange, 2006). L'altération de l'expression des défensines pourrait avoir des effets délétères sur l'homéostasie intestinale et conduire au développement de l'inflammation par la prolifération bactérienne (Ramasundara et al., 2009). La possibilité que le stress puisse affecter ce mécanisme de défense innée est appuyée par des données récentes montrant que le stress psychologique diminue la libération de peptides anti-microbiens au niveau de la peau et que le stress de séparation maternelle ou l'administration périphérique chronique d'Ucn2 diminuent le nombre de cellules de Paneth (Estienne et al., 2010).

d) Implication du système CRFergique dans le cancer

i. Expression dans les cancers

Les récepteurs au CRF et leurs ligands sont exprimés dans de nombreux types de cancers (Kaprara et al., 2010b). Cependant, un criblage de l'expression des récepteurs au CRF par une autoradiographie de CRF marqué n'a pas permis d'identifier le système CRFergique dans différents tissus tumoraux comme les tumeurs exocrines du pancréas, les cancers de la prostate, les cancers du poumon à petites cellules ou les adénocarcinomes colorectaux (Reubi et al., 2003), alors qu'ils sont exprimés dans des conditions normales. Ceci suggère que la perte des récepteurs peut contribuer à la transformation maligne et/ou la progression tumorale ou en être une conséquence. Des conclusions similaires ont été établies dans le cancer de la prostate caractérisée par une perte de l'expression du CRF2 par rapport aux tissus sains

(Tezval et al., 2009). La comparaison d'expression des récepteurs CRF avec des tissus qui expriment fortement ces molécules comme les tumeurs endocrines peut aussi conduire à des erreurs d'interprétations. Par exemple, l'étude de Reubi et collaborateurs a montré que le CRF2 n'est pas exprimé dans les CCR alors qu'il a déjà été détecté et qu'il est fonctionnel dans les cellules HT-29 (Kokkotou et al., 2006).

La distribution distincte et l'activité du système CRFergique au sein de la tumeur ou entre les tissus normaux et les tumeurs renforcent l'hypothèse que les récepteurs au CRF pourraient moduler différents aspects cellulaires dans les cancers. Une étude réalisée sur 51 patientes atteintes de cancer de l'endomètre non traité a montré que, dans 61% des tumeurs, le marquage du CRF2 est diffus dans le cytoplasme, alors qu'il est nucléaire dans les cellules normales des glandes endométriales (Miceli et al., 2009). La localisation cytoplasmique du CRF2 a été associée au stade plus avancé du cancer (Florio et al., 2006; Miceli et al., 2009).

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

ii. Implication du système CRFergique dans la progression tumorale

Le système CRFergique peut influencer le développement tumoral de plusieurs façons :

En activant la voie Wnt

La dissociation des jonctions intercellulaires conduit au développement de processus inflammatoire mais également à la dédifférenciation cellulaire précédant la carcinogénèse (Jankowski, Bedford, & Kim, 1997).

Ces altérations épithéliales sont particulièrement prononcées dans les tissus de RCH, pathologie pour laquelle le développement de tumeurs malignes est fréquent (notament par rapport aux patients atteints de MC). Ceci suggère que les perturbations des molécules associées aux jonctions sont susceptibles d'être impliquées dans la cancérogenèse chez des patients MICI.

En plus d'être des protéines d'adhérence cellule-cellule, les caténines sont aussi des molécules de transduction de signaux qui contrôlent la prolifération et les processus de migration. L'induction de la signalisation Wnt, principalement en affectant la βctn, joue un rôle crucial dans le maintien à la fois du compartiment prolifératif des cryptes et la tumorigenèse des tissus.

L'altération de cette voie de signalisation est caractéristique des cancers du côlon, du sein, de la prostate et des ovaires, qui expriment tous les molécules du système CRFergique (Beachy et al., 2004; Gebeshuber et al., 2007).

Dans la lignée du cancer du sein 4T1 ou de neuroblastomes Neuro2a, le CRF périphérique modifie l'expression de la β-caténine et de SMAD2 favorisant ainsi la prolifération cellulaire induite par Wnt et la TGF-β (Arranz et al., 2010; Mohammad et al., 2002).

En contrôlant l'apoptose

La croissance tumorale peut résulter de l'inhibition de l'apoptose. Ce phénomène d'échappement à la mort cellulaire procure à la tumeur des caractéristiques qui participent à la résistance aux traitements de chimiothérapie et à la survie des cellules métastatiques durant leur trajet pré-implantatoire.

L'apoptose peut être inhibée ou stimulée par le système CRFergique selon le tissu étudié et le récepteur activé.

Ainsi, l'apoptose est promu dans les cellules de carcinome pulmonaire à petites cellules *via* l'activation de CRF2 (Chatzaki et al., 2006). Alors que l'apoptose est inhibée dans les cellules de cancer gastriques AGS après incubation avec le CRF, l'Ucn1 et l'Ucn2 (Huang et al., 2009). Ce résultat est également observé dans les cellules de rétinoblastomes traitées au CRF où l'inhibition de l'apoptose est permise par la régulation négative de la pro-caspase-3 dépendant de PKA (Radulovic, Hippel, & Spiess, 2003).

Dans la lignée cellulaire MR1 de cancer de la prostate de souris, les récepteurs CRFergiques ont des effets opposés sur l'apoptose : l'activation de CRF1 *via* CRF réduit l'expression de Bcl-2 et active la caspase 9 (par le biais de Bax) alors que celle de CRF2 *via* l'Ucn2 augmente l'expression de Bcl-2 et diminue l'expression de Bax (par le biais d'AKT) (Jin et al., 2011).

En régulant l'angiogenèse

Le système CRFergique influence la croissance tumorale en influençant l'angiogenèse. L'Ucn2 inhibe la croissance et la vascularisation des tumeurs des poumons de type carcinome de Lewis ou de certains carcinomes hépatocellulaires (Hao et al., 2008; J. Wang et al., 2008).
Le CRF2 inhibe ou stimule l'angiogenèse selon le tissu cancéreux et la voie de signalisation engagée.
Ainsi les cellules musculaires lisses vasculaire, l'expression du CRF2 diminue la sécrétion de VEGF ce qui conduit à la diminution de la prolifération cellulaire. Dans les carcinomes du poumon humain à petites cellules, le CRF2 inhibe l'expression du VEGF par la phosphorylation de p38/AKT (J. Wang, Jin, Chen, & Li, 2010). Par ailleurs, les souris KO CRF2 deviennent hyper-vascularisées après la naissance (Bale et al., 2002).
En opposition, dans la peau, le CRF est impliqué dans l'augmentation de l'angiogenèse locale et de la perméabilité vasculaire en agissant sur la dégranulation des mastocytes (Arbiser et al., 1999; Theoharides et al., 1998). La lignée humaine HMC1 de cellules mastocytaires produit également du VEGF en réponse à l'administration du CRF *via* l'activation du CRF1 (Cao et al., 2005). L'inhibition du CRF1 par l'Antalarmine supprime aussi la néo-angiogenèse dans les tumeurs induites avec la lignée cellulaire 4T1 de cancer du sein en utilisant des mécanismes dépendants de Cox-2 plutôt que la régulation du VEGF (Arranz et al., 2010).
Dans l'intestin, lors de la colite induite au DSS, les souris KO pour le CRF1 ou pour le CRF2 présentent respectivement une diminution ou une augmentation de la néogenèse intestinale associée à une variation du niveau de VEGF (Im et al., 2010).
Ces observations conduisent à la conclusion que le CRF1 est pro-angiogénique, tandis que le CRF2 est anti-angiogénique, pas seulement lors de l'inflammation mais également dans les conditions basales (Bale et al., 2002).

En favorisant la migration et l'invasion cellulaire

Le système CRFergique est également décrit pour affecter la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ce qui facilite la progression tumorale et la formation de métastases (Androulidaki et al., 2009; Y. Yang et al., 2007).

Cette augmentation de la migration cellulaire pourrait être entraînée par des réarrangements du cytosquelette et la phosphorylation de la protéine FAK au niveau des adhérences focales (Androulidaki et al., 2009; Olson and Sahai, 2009).
Le CRF induit la migration et l'invasion des cellules B16F10 issues de mélanomes murins de manière dépendante d'une activation transitoire de ERK *via* le CRF1 (Yang et al., 2007).
De façon similaire, il participe à la migration des cellules MCF7 (Androulidaki et al., 2009). Dans les CCR, l'activation transitoire de ERK semble être suffisante pour induire la phosphorylation de FAK sur ses résidus sérine, qui conduit ultérieurement à la migration et à la formation de métastases (Jiang et al., 2007; Li et al., 2010).

Une réorganisation de l'actine a été observée après le traitement des cellules At1 avec le CRF (Arranz et al., 2010). La morphologie du cytosquelette d'actine peut être modulée par les RhoGTPases activées par les récepteurs CRFergiques (Swinny & Valentino, 2006).
Le CRF1 induit l'activation de Rac-1 par la PKA et la voie MAPK, alors que le CRF2 induit l'activation de RhoA *via* la PKC. L'implication du système CRFergique dans la régulation de la progression du cancer et des métastases est appuyée par le fait que l'expression du CRF pourrait corréler avec le stade tumoral comme il a été observé dans les cancers de l'ovaire (Minas et al., 2007), mais pas pour les cancers du sein (Kaprara et al., 2010a).
Par ailleurs, le CRF2 est exprimé en particulier dans les zones d'invasion péri-neurales des cancers du sein où il peut jouer un rôle dans le caractère invasif des tumeurs (Kaprara et al., 2010a). Par conséquent, s'il n'y a pas d'augmentation générale de l'expression du CRF2, celle-ci peut être locale.

Dans les cellules HT-29, nous avons montré que l'activation du CRF2 par l'Ucn3 induit l'activation de la kinase src qui contribue à la dissociation des cellules et à la migration de ces cellules (Ducarouge et al., 2013). Ces données seront présentées dans la première partie des résultats. Les kinases de la famille src sont les principaux régulateurs des JA et elles interagissent avec les deux récepteurs au CRF (Yuan et al., 2010a).

En conclusion, la signalisation des récepteurs au CRF est impliquée dans des voies carcinogènes. Parmi ces voies, la signalisation PI3K/AKT est un modulateur clef de la survie des cellules, du cycle cellulaire et de l'angiogenèse.
Récemment, la voie PI3K a été suggérée pour jouer un rôle critique dans les effets dépendant des deux récepteurs au CRF (Chandras et al., 2009; Punn et al., 2006). Le CRF est également un modulateur du facteur de transcription NFκB qui est un régulateur de gènes contrôlant la

prolifération cellulaire, la survie, la différenciation entérocytaire et la production de cytokines comme le TNFα.

Une activation aberrante de NFκB est souvent détectée dans les entérocytes et les macrophages de la *lamina propria* de biopsies prélevées chez des patients atteints de MICI et/ou de tumeurs colorectales (Rogler et al., 1998; Yu et al., 2003). Dans un modèle de CCR associée aux colites chez des animaux ayant une inactivation génétique de IκB (activation de NFκB), il a été démontré que le NFκB épithélial contribue à l'initiation et la promotion de la tumeur en supprimant l'apoptose.

II. Le système cholinergique

1) La stimulation du nerf vague

La voie anti-inflammatoire cholinergique peut être une cible thérapeutique dans le traitement de différentes pathologies inflammatoires notamment les MICI, les colites mais aussi la polyarthrite rhumatoïde, le choc septique ou hémorragique (Ghia, Blennerhassett, Kumar-Ondiveeran, Verdu, & Collins, 2006).

a) La voie cholinergique anti-inflammatoire

i. Origine historique

Le concept de la voie cholinergique émerge des études des actions anti-inflammatoires du CNI-1493 (activateur des efférences vagales). Le CNI-1493 est injecté en intracerebroventriculaire chez les rats anesthésiés avant d'induire une inflammation. Cette dernière est initiée par l'injection locale d'un produit irritant, le carageenin, dans la patte arrière de l'animal (Borovikova, Ivanova, Nardi, et al., 2000).
La présence du CNI-1493 permet de diminuer l'inflammation provoquée par le carageenin (diminution de la libération de TNFα et de cytokines pro-inflammatoires).
L'effet anti-inflammatoire est abrogé par la vagotomie cervicale bilatérale ou l'utilisation d'atropine, antagoniste des récepteurs cholinergiques démontrant que le nerf vague intact est requis pour obtenir un effet anti-inflammatoire de CNI-1493.
L'action de ce dernier peut être imitée par la stimulation électrique du nerf vague libérant de l'ACh (Borovikova, Ivanova, Zhang, et al., 2000). L'équipe de Tracey a démontré que la stimulation du nerf vague ou l'utilisation du CNI-1493 dans un contexte d'inflammation systémique produite par les LPS (15 mg/kg), permettent de diminuer l'inflammation. Cela conduit à la suppression de la production de cytokines anti-inflammatoires tels que le TNFα circulant ou tissulaire (dans le foie ou la rate) (Bernik, 2002; Borovikova, Ivanova, Zhang, et al., 2000).

Lors d'un état inflammatoire, les macrophages libèrent du TNFα et les interleukines IL-1β, IL-6 et IL-18. Cette sécrétion de molécules pro-inflammatoire est significativement diminuée par l'utilisation d'ACh et de nicotine, deux agonistes des récepteurs nicotiniques (nAChR).

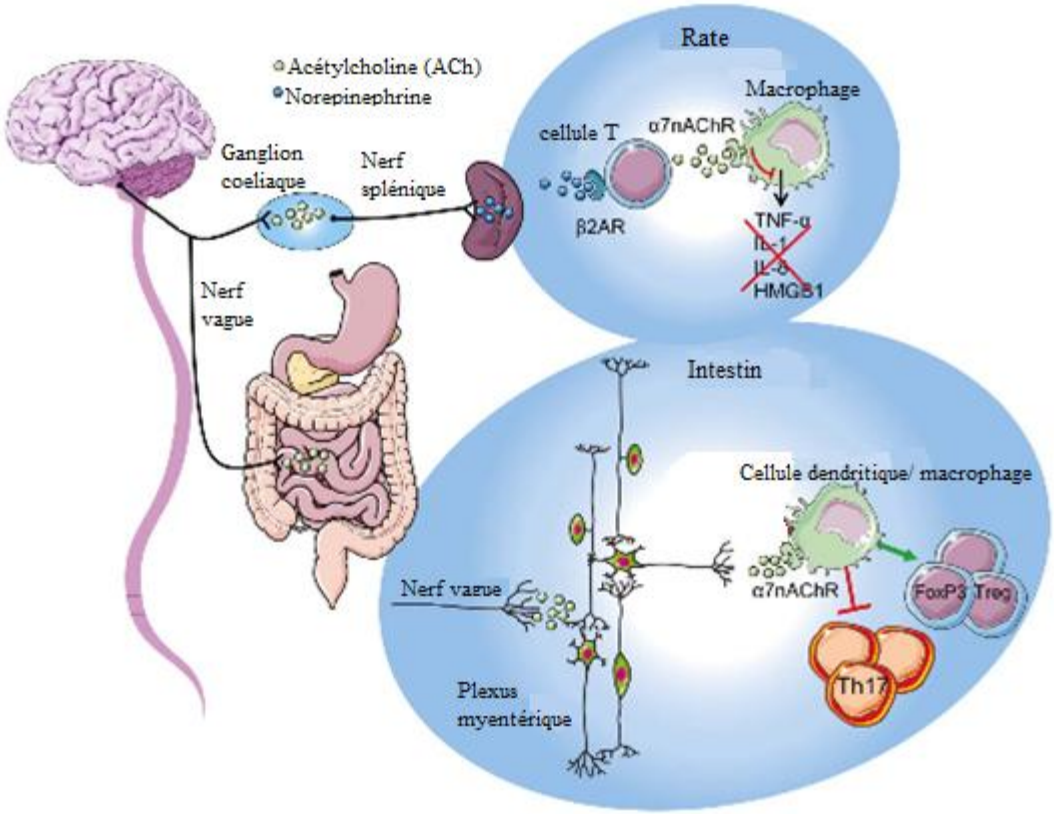


Figure 40. Representation schématique de la voie cholinergique anti-inflammatoire.

Lors d'une inflammation systèmique, le système nerveux central est activé par les afférences vagales. Après intégration, cette information stimule les efférences vagales par le ganglion coeliaque et module la réponse immunitaire dans la rate. L'activation des neurones adrénergiques dans la rate conduit à la libération de norepinephrine qui induit la libération d'acétylcholine (ACh) par les cellules T. L'Ach interagit avec les récepteurs α7 nicotinique (α7 nAChR) exprimés à la surface des macrophages. Cela conduit à la diminution de la libération de cytokines dont TNF-α, IL-1, IL-18, HMGB1.
Lors d'une inflammation intestinale, le système nerveux central activé par le bras afférent du nerf vague déclenche l'activation des efférences vagales stimulant les neurones du plexus myentérique. Cela conduit à la libération d'ACh activant les α7 nAChRs portés à la surface des cellules dendritiques et des macrophages. Cela permet de moduler l'inflammation intestinale et de restaurer l'homéostasie intestinale.

Wang et *al.* identifient le récepteur nicotinique α7 (α7 nAChR) comme le principal récepteur modulant l'activité des macrophages (Hong Wang et al., 2003). Cette équipe a montré que l'action anti-inflammatoire de l'ACh est abolie chez les souris traitées avec des antagonistes des α7 nAChR ou ne possédant pas de récepteurs nicotiniques α7 (α7 nAChR-KO) (Hong Wang et al., 2003). De plus, l'action anti-inflammatoire du nerf vague est supprimée si la rate est chirurgicalement dénervée (absence d'innervation sympathique) ou si les animaux sont traités par réserpine conduisant à la déplétion de noradrénaline (Rosas-Ballina et al., 2011).
Les découvertes précédemment explicitées ont fait naître la notion de "voie cholinergique anti-inflammatoire" où le nerf vague module la réponse immunitaire dans la rate.

ii. La voie cholinergique anti-inflammatoire

Cette voie aux propriétés anti-inflammatoire découverte par la groupe de Tracey (Borovikova, 2000), repose sur l'activation des efférences vagales (Pavlov, Wang, Czura, Friedman, & Tracey, 2003) et la sécrétion d'ACh (figure 40). Elle est complémentaire de l'axe corticotrope qui est la voie classique. L'information de la présence d'une inflammation périphérique est transmise par les afférences vagales jusqu'au noyau du tractus solitaire, au niveau du système nerveux central. En réponse des potentiels d'action sont transmis à la périphérie induisant la sécrétion d'ACh par les efférences vagales. Ce neurotransmetteur interagit avec les récepteurs cholinergiques (plus spécifiquement α7 nAChR ou α2β4 nAChR) portés par les cellules immunocompétentes comme les macrophages. La liaison de l'ACh avec α7 nAChR induit l'inhibition du facteur de transcription NFκB, responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (van der Zanden et al., 2009)
Le facteur NFκB est constitué de deux sous-unités hétérodimèriques ou homodimériques : p65 et p60 (Funakoshi et al., 2012). En l'absence de stimulation ce facteur de transcription est associé, dans le cytoplasme, à son inhibiteur IκB. Lors d'une réaction immunitaire, ce dernier est phosphorylé par la kinase IκK provoquant sa dissociation avec NFκB qui peut alors migrer dans le noyau induisant la transcription de gènes pro-inflammatoires. La liaison de l'ACh aux α7 nAChR exprimés à la surface des cellules immunitaires favorise cette voie en inhibant la phosphorylation d'IκB, (Borovikova, 2000; Parrish et al., n.d.; Saeed et al., 2005; Hong Wang et al., 2003; Yoshikawa et al., 2006).
Cependant après son activation, α7 nAChR change de conformation, il recrute alors JAK2. Pour former un complexe hétérodimèrique pouvant déclencher les voies de signalisation anti-

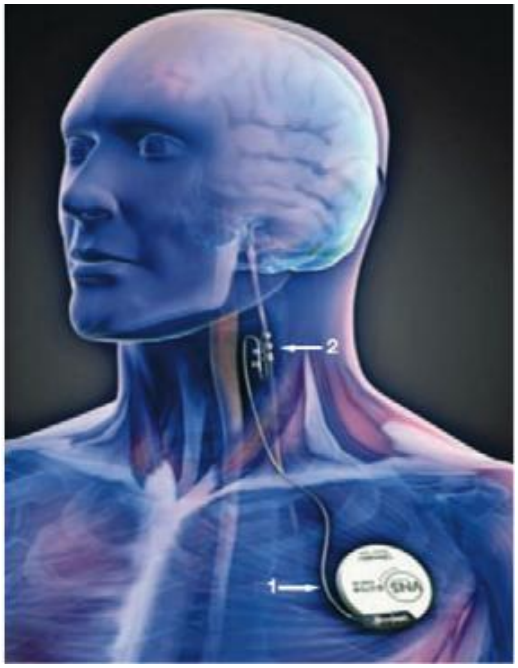
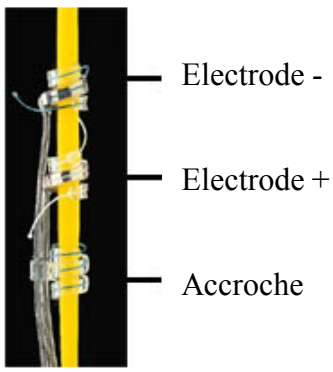


Figure 41. Le système (de Cyberonics) permettant la stimulation du nerf vague.

Le stimulateur (1) qui est placé dans une poche sous cutanée au niveau de la clavicule gauche. Une électrode en spiral (2) est accrochée sur le nerf vague gauche.



Electrode en spiral placée sur le nerf vague gauche (représentée en jaune).

inflammatoire de STAT3 et SOCS3 conduisant à l'inhibition de l'activation transcriptionnelle de NFκB.

iii. La neurostimulation vagale (NSV)

Actuellement, la stimulation électrique des afférences vagales a montré son intérêt pour le traitement de certaines formes d'épilepsie ou de dépression (Ghia et al., 2006; Groves & Brown, 2005; Mauguière, 1996). Le neurostimulateur utilisé est implanté sous la clavicule du patient et une électrode de stimulation est positionnée sur la partie cervicale du nerf vague gauche (figure 41). Une stimulation sur le nerf vague droit induirait des troubles de la fréquence cardiaque puisqu'il innerve le myocarde au niveau des nœuds de Keith et Flack.
Jusqu'à présent 60 000 patients ont bénéficié de la NSV comme traitement dans lequel seules les afférences ont été stimulées afin d'activer le système nerveux central. Ce traitement est utilisé dans l'épilepsie et la dépression pharmaco-résistante.

Dans le traitement de l'épilepsie

La première implantation a été réalisée en 1988 aux Etats-Unis pour le traitement de certaines formes d'épilepsie réfractaire aux médicaments. Cette technique a été approuvée par la « Food and Drug Administration » (FDA) en 1994 et 1997 en Europe et aux Etats-Unis respectivement. La NSV permet une diminution des crises chez 50% des patients et une absence de ces dernières chez 20%. Le mécanisme d'action de la NSV n'est pas entièrement compris. Cependant, la diminution de l'activité des structures limbiques et la sécrétion de norépinephrine pourraient être impliquées. De plus, les patients épileptiques traités par NSV ressentaient une amélioration de leurs humeurs.

Dans le traitement de la dépression

La NSV est utilisé comme moyen thérapeutique pour soigner certaines formes de dépressions pharmaco-résistantes. Son efficacité est corrélée avec la durée du traitement.
En effet, après 3 mois de traitement, 37% des patients ressentent une amélioration et 17% des sujets étudiés sont en rémission contre respectivement 53% et 17% des cas après un an de soins (Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Müller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, 2008).
La NSV appliquée à la dépression a été approuvée par la FDA en Europe (en 2001) et aux Etats-Unis (en 2005).

Le stimulateur est programmé et permet de délivrer une stimulation avec des paramètres d'intensité, de fréquence et de cycle précis. Pour le traitement de ces deux pathologies, la fréquence de stimulation est comprise entre 20 et 30 Hz ce qui permet de stimuler les afférences vagales et d'avoir un effet thérapeutique au niveau du système nerveux central.
De plus, peu d'effets secondaires sont répertoriés. Seuls un enrouement de la voix, une toux, un essoufflement et un picotement sont ressentis au début du traitement et s'estompent avec le temps (Bao et al., 2011).

En vue des effets anti-inflammatoires associés à de faibles effets secondaires, du faible coût (comparé aux traitements pharmacologiques comme les biothérapies) et de l'absence des problèmes d'observance, il s'avère que la NSV est une thérapie prometteuse dans le traitement des MICI.

Dans le traitement des MICI

A la différence du traitement de la dépression ou de l'épilepsie, l'effet anti-inflammatoire dans celui des MICI passent par les efférences vagales. La plupart des expériences induisant une activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire par la NSV ont été réalisées de manière aiguë sur l'animal anesthésié (Bernik, 2002; Borovikova, Ivanova, Zhang, et al., 2000; Guarini et al., 2003; The et al., 2007).

La particularité de notre laboratoire est d'avoir réalisée la NSV de façon chronique sur des animaux vigiles (Meregnani et al., 2011). Cette étude originale est conduite sur des rats Sprague-Dawley où la colite est induite par injection intra-colique de TNBS. L'injection de ce produit chimique est réalisée une heure avant la séance de NSV.
La NSV est réalisée durant 3 heures pendant 5 jours consécutifs avec les paramètres suivants : 1 mA, 5 Hz, 10 secondes ON, 90 secondes OFF.
Des fréquences basses (1-5 Hz) sont classiquement utilisées pour obtenir un effet anti-inflammatoire périphérique *via* les efférences vagales. Cependant, une IRMf réalisée sur des rats stimulés a mis en exergue l'implication des afférences et des efférences vagales (Reyt et al., 2010).
Les rats TNBS présentent un trouble de la thermorégulation circadienne. Alors que chez les animaux contrôles, la température corporelle est augmentée la nuit pour palier à une diminution de l'activité locomotrice, les rats TNBS quant à eux, présentent une hypothermie. La NSV chez le rats TNBS ne permet pas d'amélioration de ce trouble thermique. Ce phénomène s'explique par la libération de TNF-α quelques heures après l'injection de TNBS.

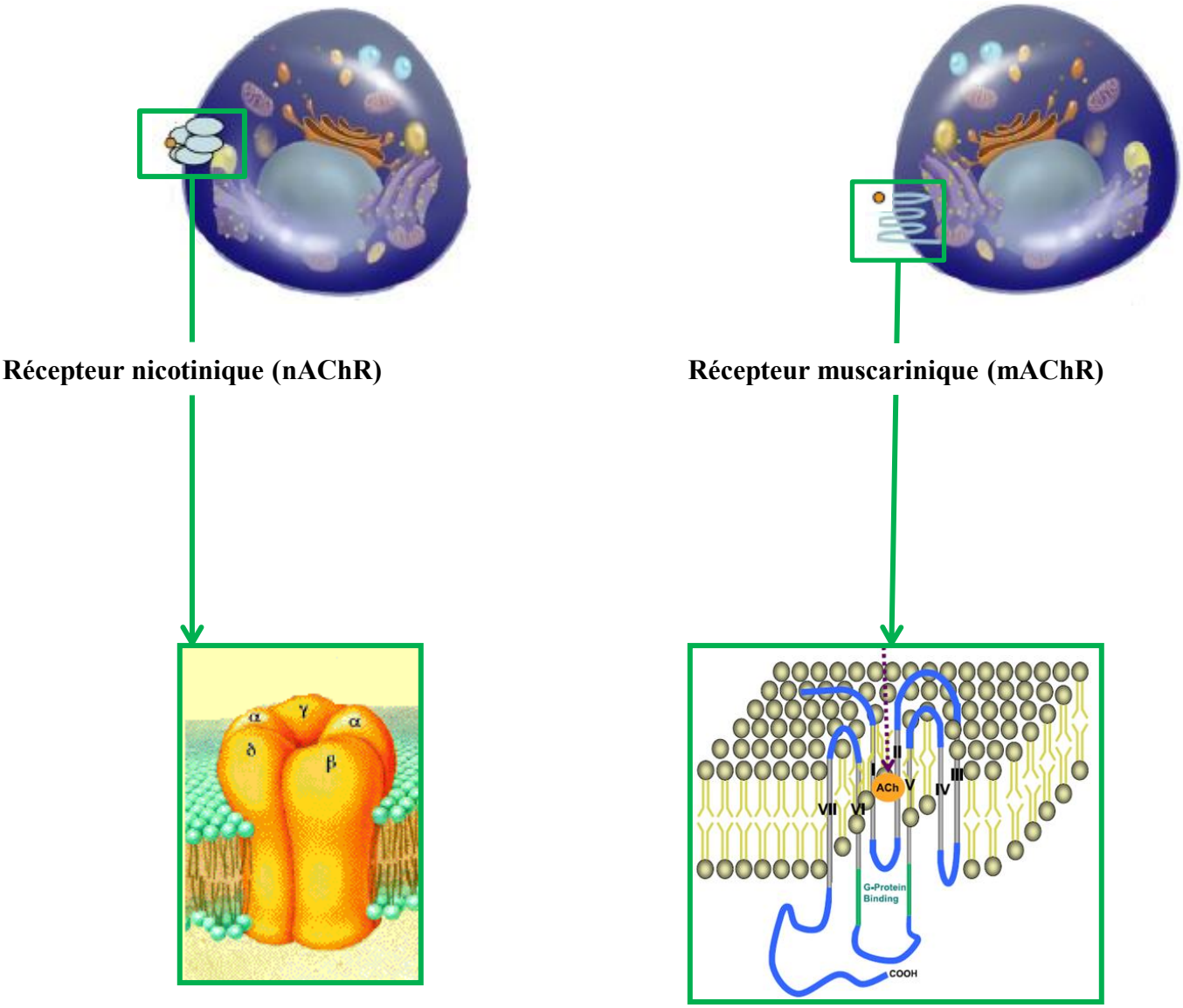


Figure 42. Les différents récepteurs cholinergiques.

Les récepteurs cholinergiques sont divisés en deux catégories: les récepteurs muscariniques (mAChR) et les récepteurs nicotiniques (mAChR)

Comme chez les patients atteints de la MC, le TNBS induit une perte de poids (4%), qui est minimisée par la NSV (0,3%). On note également une amélioration des caractéristiques histologiques (du grade IV au grade 0) et une diminution de l'inflammation (illustrée par la concentration de myéloperoxidase passant de 25 ng/ mg de protéines à 10 ng/ mg de protéines) dans les zones adjacentes des lésions induites par le TNBS.

En revanche, aucune amélioration n'est observée dans la zone de la lésion induite par l'injection du TNBS.
La NSV pourrait donc avoir un intérêt dans le traitement de la MC modérément active et dans la prévention des rechutes et en traitement d'entretien de la rémission. Cependant les mécanismes sous-jacents à l'effet protecteur de la NSV restent non identifiés. Toutefois, des pistes seront discutés dans la partie « Rôle protecteur des récepteurs nicotiniques dans les MICI ».

b) Les récepteurs cholinergiques et leurs ligands

Les récepteurs cholinergiques (AChR) sont divisés en deux catégories : les récepteurs muscariniques (mAChR) et les récepteurs nicotiniques (nAChR) (figure 42).

i. Les récepteurs muscariniques

Ce sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Il en existe cinq sous-types, M1-M5. Les mAChRs ont une structure commune à sept segments hydrophobes transmembranaires reliés par des boucles (figure 42). Les segments transmembranaires sont hautement conservés (66% d'homologie).
Entre le cinquième et le sixième segment transmembranaire, les mAChRs possèdent une boucle intracytoplasmique qui exhibe une divergence importante entre les différents récepteurs. Elle est considérée comme responsable de la diversité des voies de signalisations activées (Karakiulakis & Roth, 2012).
Cela inclut la stimulation de phospholipases C, A2 et D, la dégradation ou la diminution de synthèse de l'AMPc, la production de GMPc, et la régulation de différents canaux ioniques.
Les récepteurs muscariniques peuvent être divisés en deux groupes selon la protéine G activée.

Le premier groupe inclu M2 et M4 mAChRs qui sont couplés avec les protéines G du type $G_{i/o}$. La stimulation de ces récepteurs amène à l'inhibition de l'adényle cyclase engendrant une diminution de la synthèse de l'AMPc.
Le second groupe composé de M1, M3 et M5 mAChRs interagissent avec les protéines G du type $G_{q/11}$. La stimulation de ces derniers récepteurs conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC). Il s'en suit une augmentation des ions calcium libres intracellulaires.

ii. Les récepteurs nicotiniques (nAChR)

Actuellement, 17 sous-unités de récepteurs nicotiniques ont été décrites chez les vertébrés. Les nAChRs sont classés en sous-unités de types α, β, γ, δ et ε (Hirota & McKay, 2006). Il existe 10 sous-unités α (α1– α10), 4 sous-unités ß (ß1- ß4) et une seule sous-unité pour les 3 types restants (γ, δ et ε). Cependant, elles partagent des propriétés structurales communes :
i) une région N-terminale extracellulaire avec 13 acides aminés dont 2 cystéines formant un pont disulfure ;
ii) 4 segments transmembranaires (M1-M4) avec une boucle cytoplasmique entre M3 et M4 contenant une séquence propre à chaque sous-unité ;
iii) une partie C-terminale extracellulaire.

Les nAChRs sont des récepteurs ionotropiques. Ce sont des protéines transmembranaires composées de cinq sous-unités formant une structure pentagonale autour d'un canal.
De plus, les nAChRs peuvent être des homo-pentamères (α7 ou α9) ou des hétéro-pentamères composés de sous-unités différentes (α2-α10 ; β2-β4). Chaque sous-unité α7 peut fixer une molécule de ligand. Ainsi les récepteurs homomériques α7 sont aptes à fixer jusqu'à 5 molécules de ligands par récepteur (Sharma, Grybko, & Vijayaraghavan, 2008).

La stimulation des nAChRs par l'ACh ou ses agonistes conduisent à la dépolarisation des membranes et à une augmentation rapide de Na^+, K^+, et Ca^{2+}. Dennis et ses collaborateurs démontrent que la voie de signalisation activée passe par AKT et par MAPK (Song et al., 2010).
On note une désensibilisation des nAChRs après leur activation. La désensibilisation est un terme général qui décrit une diminution ou une perte de la réponse biologique à une stimulation prolongée ou répétée. Cela se traduit par une accumulation des récepteurs dans un état réfractaire non-conductant. Lorsque l'agoniste est retiré du milieu, le récepteur peut

Tissus	Récepteurs	Type cellulaire/ région tissulaire	Méthode	Références
Ileum	M3	Muqueuse, vaisseaux sanguins, muscularis mucosae	IF	Sato 1999; Oue 2000; Lindqvist 2002; Anini 2003; Banks 2004
Colon (juvénile)	M1, M2, M3	Cellules épithéliales, cellules endocrines	IHC; ISH	
	M2, M3	Muqueuse, muscle lisse, neurone myentérique	IHC	
Colon	M1	Muqueuse	IF	
	M3	Cellules épithéliales des cryptes		
Sang	M1, M2, M3, M4, M5	Leucocytes mononucléaires	RT-PCR	
Lignées cellulaires	M1, M2, M3	NCI-H716	WB, RT-PCR	
	M1, M2, M3, M4, M5	CEM, MOLT-3, HUT-78, HPB-ALL	RT-PCR	
	M3	H508		
	M1, M3	HT-29		

Tableau 13. Distribution et expression des différents sous-types de récepteurs muscariniques au niveau de l'intestin humain.

Abréviations: IF: immunofluorescence, IHC: immunohistochimie, ISH: hybridation *in situ,* RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction, WB: western blot.

retourner à son état de repos initial. Cependant après un traitement chronique, il est observé un retour incomplet à l'état initial qui peut refléter une accumulation durable de récepteurs dans un ou plusieurs états de désensibilisation ou bien la perte irréversible à la surface des cellules (Simasko, Soares, & Weiland, 1986).

Les variations de fluorescence du Dns-C_6-Ch ont mis également en évidence deux états désensibilisés différents : un état de désensibilisation intermédiaire rapide (mis en place quelques millisecondes ou secondes après la présence de l'agoniste) puis un état de désensibilisation lent (de quelques secondes à quelques minutes après l'état intermédiaire) qui correspond à un canal fermé. Ces deux états sont imperméants aux ions (Heidmann, Bernhardt, Neumann, & Changeux, 1983; Heidmann & Changeux, 1980). On note des différences de désensibilisation des nAChRs selon les sous-unités qui les composent. Ainsi, la sous-unité α7 a la vitesse de désensibilisation la plus élevée. En revanche, les sous-unités β permettent de diminuer la vitesse de désensibilisation.

Ainsi, si α7 est exprimée avec β4, la vitesse de désensibilisation est divisée par deux (Khiroug et al., 2002).

iii. Distribution des récepteurs cholinergiques

Les récepteurs cholinergiques sont ubiquitaires, ils peuvent être exprimés au niveau du système nerveux central et périphérique, de cellules immunocompétentes (comme les macrophages, les monocytes et les lymphocytes) de certains organes (tels que la rate) et des tissus (certains tissus épithéliaux). Ils sont donc présents au niveau du système intestinal (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004).

A l'aide d'expériences d'immunofluorescence, d'immunohistochimie, de western blot et de RT-PCR, il a été montré une expression différentielle des sous-types de récepteurs cholinergiques en fonction des segments intestinaux. Ainsi, M1, M2 et M3 mAChRs sont présents au niveau du côlon humain alors que seul M3 mAChR est exprimé au niveau de l'ileum.

La distribution de ces différents récepteurs sont résumés dans le tableau 13.

Quant aux récepteurs nicotiniques, généralement les sous-unités α4, β2 et α7 prédominent dans le système nerveux central alors que α3, β2 et α7 sont préférentiellement présents dans le système nerveux périphérique (Gotti & Clementi, 2004) (tableau 14).

Tissus	Récepteurs	Type cellulaire/ région tissulaire	Méthode	Références
Ileum et colon	α3 (α5, β4 ?)	Neurones du plexus myentérique, épithelium, tissu lymphoïde	ISH, IHC	Hiemke 1996, Battazgliolo 1998, Sato 1999, Richardson 2001 et 2003, Summers 2003
Sang	α3, α4	Lymphocytes $CD4^+$	RT-PCR	
	α2, α5, α6, α7, β2	Leucocytes mononucléaires		
Lignées cellulaires	α4, α5, α7, β1	HT-29		
	α3	Jurkatt, MOLT-4T	NB	
	α2, α3, α5, α6, α7, β4	CEM, MOLT-3, HUT-78, HPB-ALL, Jurkatt	RT-PCR	
	α2, α5, α6, α7, β2, β4	BALL-1, NALM-6		

Tableau 14. Distribution et expression des différents sous-types de récepteurs nicotiniques au niveau de l'intestin humain.

Abréviations: IF: immunofluorescence, IHC: immunohistochimie, ISH: hybridation *in situ,* NB: nothern blot RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction.

iv. Ligands

Ligand endogène

L'acétylcholine (ACh) est le ligand endogène des AChRs. Il peut être libéré par les terminaisons nerveuses du système somatique et parasympathique ou de manière autocrine par les cellules non-neuronales. L'ACh est synthétisé par la conversion de l'acetyl-CoA et de la choline en ACh par l'acétylcholintransferase (ChAT) (Hebb & Whittaker, 1958; Hebb, 1954) (figure 43).

En 1920, l'ACh est décrit comme un neurotransmetteur. Ce n'est qu'en 2003 que la distinction entre son rôle de neurotransmetteur et son rôle de molécule de signalisation dans des tissus non neuronaux est découverte (Grando, 2003; Metzen, Bittinger, Kirkpatrick, Kilbinger, & Wessler, 2003).

Comme un neurotransmetteur, l'ACh synthétisé est d'abord transporté par des vésicules synaptiques puis est libéré en masse au niveau des terminaisons axonales où il en résulte un potentiel d'action.

Cependant, dans les cellules non-neuronales l'ACh n'est pas stocké dans des vésicules. Sa libération, facilitée par des transporteurs cationiques, est continue et plus lente que dans les tissus nerveux. Dans tous les tissus, l'ACh est rapidement dégradé par une enzyme spécifique, l'acetylcholinesterase (AChE). On trouve également dans l'intestin une cholinestérase non-spécifique, la butyrylcholinesterase qui permet la dégradation de l'ACh.

La bile permet également d'activer les récepteurs couplés aux protéines G dont les mAChRs. C'est plus spécifiquement la taurine associée à l'acide lithocholique qui conduit à l'activation des M3 mAChR stimulant ainsi la sécrétion de pepsinogène, élément clé de la digestion stomacale.

Les nAChRs peuvent être régulés par SLURP-1 et 2 (*secreted lymphocyte antigen-6/ urokinase type plasminogen activate- related peptide*), membre de la famille Ly-6/ μPAR. Ces peptides agissent de manière autocrine et paracrine sur les nAChRs et plus particulièrement sur α7 nAChR (Grando, 2008). Chimienti et *al.* mettent en évidence que SLURP-1 est un agoniste allostérique qui permet de moduler les fonctions des nAChRs en présence d'ACh. SLURP-1 potentialise ou inhibe α4β2, α7 et α3β2 nAChR de façon dépendante de la concentration (Chimienti et al., 2003).

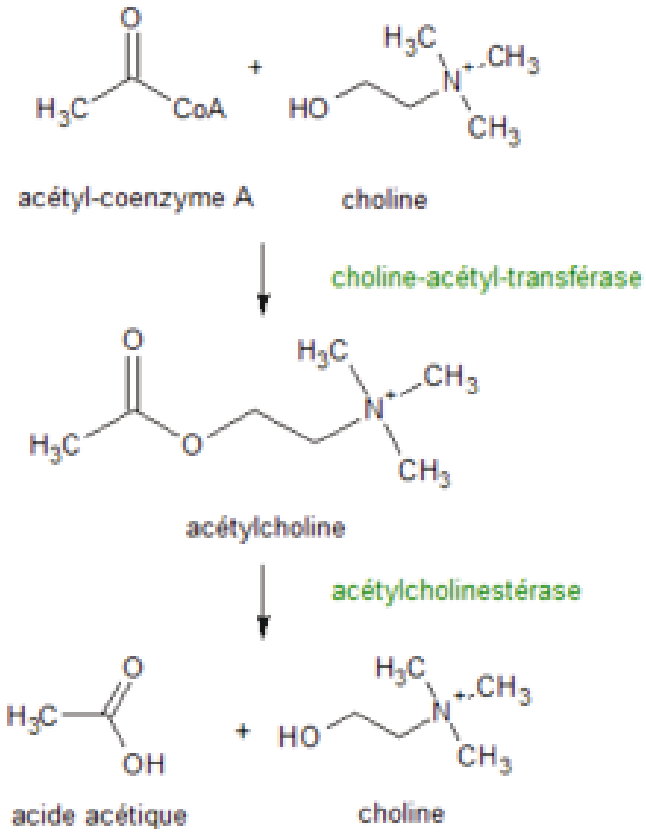


Figure 43. Métabolisme de l'acétylcholine (ACh).

L' acétylcholine est synthétisée en deux étapes :
D'abord la formation de l'acétyl Coenzyme A , à partir de l'acétate et du coenzyme A. La réaction est catalysée par l'AcéthylCoA synthétase.
Puis il y a formation de l'acétylcholine à partir de la choline grâce à une choline acétyltransférase (ChAT).

La choline présente dans les tissus a deux origines : exogène, c'est-à-dire alimentaire, et endogène, par biosynthèse à partir de la glycine en passant par les étapes sérine, éthanolamine, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-choline et choline.

Les tissus qui contiennent de l'acétylcholine et des enzymes permettant sa synthèse, contiennent aussi des cholinestérases qui hydrolysent l'acétylcholine.
On distingue deux types de cholinestérases:
*L'acétylcholinestérase (AChE), présente dans le tissu nerveux et le globule rouge.
*La butyrylcholinestérase, présente dans d'autres tissus tels que le cœur, le plasma et le système digestif.

Ligands exogènes

Il existe des composés permettant de stimuler spécifiquement les récepteurs cholinergiques. Les agonistes et antagonistes mis à notre disposition permettent d'analyser le rôle de chaque récepteur dans des processus physiologiques (transport ionique, système immunitaire...) ou physiopathologiques (prolifération cellulaire, invasion...), ainsi que les voies de signalisation activées par chaque récepteur cholinergique.

Chaque ligand a une affinité différente pour chaque sous-type de récepteurs cholinergiques.
Par exemple le carbachol, agoniste des AChRs, a une affinité supérieure pour les M1 mAChRs (K_i= 205 nm) par rapport aux M3 mAChRs (K_i= 93,4 nm) et aux M5 mAChRs (K_i= 37,7 nm).

Divers agonistes sont également capables de se lier spécifiquement aux récepteurs nicotiniques. L'agoniste naturel est l'acétylcholine mais il existe des ligands capables d'activer spécifiquement les différents sous-types de récepteurs nicotiniques.
La nicotine (K_i= 400-14 000 nm) permet la stimulation des nAChRs mais pas celle des mAChRs. De plus, alors que les ligands physiologique (ACh et choline) sont rapidement dégradés par l'AChE ou la butyrylcholinesterase, la nicotine n'est pas éliminée par ces enzymes (Faghih, Gopalakrishnan, & Briggs, 2008). En effet, elle est dégradée par les enzymes du foie. Son temps de demi-vie est de 120 minutes (Matta et al., 2007). L'action de la nicotine sur les nAChRs est donc très stable et par conséquent elle est capable de participer aux processus qui sont moins accessibles par l'ACh (Hai Wang & Sun, 2005).
A l'inverse, le venin de serpent permet l'inhibition des nAChRs. Ce dernier contient de l'α-bungarotoxine et du methyllycaconitine, tous deux antagonistes de α7 nAChR.
Le choix du ligand doit donc se faire selon le récepteur à activer ou à inhiber.

c) Rôle des récepteurs cholinergique dans l'homéostasie intestinale

i. Transport ionique :

L'épithélium intestinal permet la séparation de deux compartiments distincts : la lumière intestinale et l'intersitium.
Les cellules polarisées permettent l'absorption du matériel luminal et la régulation du passage de substances comme les nutriments, les électrolytes et l'eau. La capacité à sécréter ou à

absorber des électrolytes et des fluides est cruciale pour le maintien de l'hydratation de l'organisme. Les mouvements de l'eau sont donc finement régulés au niveau intestinal. Cette fonction clé est permise par la coordination de l'activité de canaux ioniques, des co-transporteurs, et des pompes ioniques.

En 1961, il a été mis en évidence que l'ACh et les agonistes cholinergiques stimulent la sécrétion de Cl^- dans l'appareil digestif des mammifères On note également une augmentation de la production de HCO_3^- et l'inhibition de l'absorption de Na^+. Le transport ionique est sous le contrôle de M1 et M3 mAChRs.

L'un des symptômes des MICI est la diarrhée associée et corrélée au développement de l'inflammation. Ce symptôme est du à l'altération du transport ionique et de la motilité intestinale (Pérez-Navarro, Ballester, Zarzuelo, & Sánchez de Medina, 2005).

En effet, dans un modèle de colite chronique induite au TNBS, il a été observé une anomalie dans la sécrétion ionique (Sánchez de Medina, Vera, Gálvez, & Zarzuelo, 2002) et une diminution de l'absorption (Sundaram & West, 1997; Sundaram, Wisel, & Fromkes, 1998). Lors de l'inflammation, la diminution de la réponse aux divers sécrétagogues est due à la réduction de la production d'AMPc par les entérocytes.

ii. Système immunitaire :

Le système cholinergique non-neuronal est impliqué dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires. L'activation des mAChRs et des nAChRs induisent de nombreux effets fonctionnels et biochimiques dans les lymphocytes et les thymocytes comme une amélioration de la cytotoxicité, de la prolifération cellulaire et une augmentation du taux d'ions calcium intracellulaire. Cela permet également le contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à la synthèse d'anticorps.

Ainsi, Zimring et *al.* rapportent une différenciation défectueuse en lymphocytes T dans les cellules T depletées en M1 mAChR ($M1^{-/-}$). En revanche, les observations réalisées dans un modèle murin $M1^{-/-}$ ou $M5^{-/-}$ infecté par le virus de la chorioméningite lymphocytaire suggèrent que M1 et M5 mAChR ne sont pas impliqués dans l'immunité virale (Zimring, Kapp, Yamada, Wess, & Kapp, 2005). Cependant, les M1/M5 mAChRs stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNFα, IFNγ et IL-6 dans des réactions immunitaires précoces. Pour étudier le rôle de ces récepteurs dans la fonction immune, des souris $M1^{-/-}$ et $M5^{-/-}$ sont traitées à l'ovalbumine (OVA). Après une semaine, les taux IgG_1 et IgM dans le sérum sont mesurés. Dans les modèles murins KO, il est noté une diminution de

la concentration d'IgG_1 comparée aux souris sauvages. Cependant, aucune variation du taux d'IgM n'est observée. La synthèse d'IgG_1 permet d'induire la polarisation des cellules T dans le lignage de Th2 (Ogawa, Fujii, Watanabe, & Kawashima, 2003). Ces travaux confirment le rôle des mAChRs et de l'ACh dans la régulation de la réponse immunitaire.

Parallèlement, lors d'une réponse immunitaire induite par l'hémocyanine de patelle, une protéine antigénique, on note une augmentation de la synthèse d'ACh (Sinha, Dannelly, & Ghosh, 2001).

Le rôle des récepteurs nicotiniques semblent antagonistes à celui des récepteurs muscariniques. En effet, dans les macrophages l'activation du récepteur α7 nAChR régule négativement la synthèse et la libération de TNFα (Hong Wang et al., 2003). Fujii et *al.* analysent la fonction d'α7 nAChR dans la régulation de l'immunité en mesurant les taux d'IgGM, TNFα, IFNγ et IL-6 dans des leucocytes mononucléaires de la rate issus de souris immunisées avec de l'OVA et dépletées en α7 nAChR. Ils mettent alors en évidence une augmentation des concentrations d'IgM, TNFα, IFNγ et IL-6 (Fujii, Watanabe, Fujimoto, & Kawashima, 2007).

Ainsi, les récepteurs muscariniques peuvent être définis comme des immuno-activateurs. Ils entraînent une augmentation de la libération d'anticorps, de cytokines et une hausse de l'activité cholinergique. Alors que les récepteurs nicotiniques peuvent être considérés comme des immunosuppresseurs en provoquant une diminution de la production d'anticorps et des cytokines.

L'activation des nAChR pourraient donc avoir un effet protecteur en inhibant l'inflammation dans les MICI.

iii. Rôle protecteur des récepteurs nicotiniques dans les MICI :

Le tabagisme a un effet bénéfique sur l'évolution de la RCH (Boyko, Koepsell, Perera, & Inui, 1987; Mokbel, Carbonnel, Beaugerie, Gendre, & Cosnes, 1998). Depuis 1976, il est observé une absence de fumeurs dans les cohortes de patients RCH. La RCH est une pathologie prédominante chez les ex-fumeurs ou les non-fumeurs. De plus, les « gros » fumeurs qui développent une RCH présentent moins d'indices histologiques et macroscopiques de la pathologie que les non-fumeurs ou les fumeurs occasionnels.

De nombreuses études démontrent que le tabagisme n'a pas seulement un effet bénéfique sur la progression de la maladie mais il améliore également les symptômes de la pathologie. De

plus, le tabac permet de diminuer le besoin de chirurgie chez les patients RCH (Cosnes, 2004; Odes et al., 2001). A l'inverse, les anciens fumeurs présentent une exacerbation des symptômes et une augmentation du besoin d'immunosuppresseurs, de corticoïdes ainsi que du taux d'hospitalisations (de Castella, 1982; Motley et al., 1987; Rudra, Motley, & Rhodes, 1989).

Cependant, le mécanisme protecteur du tabagisme n'est pas pour autant élucidé. Il est possible que le tabac ait un effet sur l'immunité humorale et cellulaire, sur la production de cytokines, sur les antioxydants et les espèces réactives à l'oxygène, les glucocorticoïdes, la perméabilité intestinale, la motilité mais aussi sur le microbiote.

La cigarette contient des centaines de substances, dont le constituant majeur est la nicotine et ses métabolites comme la cotinine. Ce sont ces derniers composés, qui sont responsables de l'effet anti-inflammatoire du tabac. Ils peuvent être utilisés comme un traitement dans l'induction de la rémission de la RCH.

Dans de nombreuses études où la nicotine (22-25 mg/jour) est administrée à l'aide de patches ou de gomme à mâcher, les patients présentent une amélioration des symptômes de la RCH. Néanmoins, il existe des effets secondaires (nausée, maux de tête, dermatite) qui sont dus à l'administration systémique de haute concentration de nicotine (Cosnes, 2004; McGilligan, Wallace, Heavey, Ridley, & Rowland, 2007; Pullan et al., 1994). Ainsi l'utilisation de la nicotine peut être efficace chez les patients RCH, spécialement chez les ex-fumeurs mais son usage est limité de par ses effets secondaires.

Il n'empêche que des études cliniques ont montré une diminution des effets secondaires lorsque la nicotine est distribuée directement au niveau du côlon ainsi qu'une amélioration des symptômes, des lésions endoscopiques et histologiques chez les patients RCH. L'administration localisée permet notamment d'utiliser la nicotine à des concentrations moins importantes que par voie cutanée (patches) ou par voie oral (chewing-gum).

La NSV par la libération d'ACh active les nAChRS portés par les cellules immunocompétentes ou les cellules épithéliales situées au niveau du côlon et a un pouvoir thérapeutique important en diminuant l'inflammation sans engendrer de sévères effets secondaires.

Paradoxalement alors que ces récepteurs prennent part au traitement des MICI, ils sont également acteurs du développement tumoral. En effet, le système cholinergique ainsi que

l'expression des récepteurs muscariniques et nicotiniques sont modifiés lors de la progression tumorale conduisant à la régulation de processus comme l'adhérence, la perméabilité, l'invasion, la migration ou l'effet anti-apoptotique.

iv. Rôle oncogénique des récepteurs cholinergiques dans les cancers

Altérations du système cholinergique dans les cancers du côlon

Les composants du système cholinergique (leur synthèse, leur stockage, leur libération) ainsi que l'expression et la fonction des mAChRs peuvent être affectés dans des conditions physiopathologiques notamment dans les cancers colorectaux.

Il a été mis en exergue que les lignées cellulaires et les tissus du côlon cancéreux expriment les M3 mAChRs. Dans 60% des cas, cette expression est augmentée de huit fois dans les tissus cancéreux comparés aux tissus normaux (Frucht, Jensen, Dexter, & Yang, 1999; W. L. Yang & Frucht, 2000).

La synthèse et la dégradation de l'ACh sont également modifiées. Alors que l'ChAT n'est que très peu présente dans les entérocytes sains, elle est fortement exprimée dans les entérocytes cancéreux (K. Cheng et al., 2008). Cependant, ce niveau d'expression est dépendant du type cellulaire. L'équipe de Cheng a mis en évidence la présence de ChAT dans certaines lignées cellulaires comme dans les cellules H508, Caco-2 et WiDr (K. Cheng et al., 2008). A l'inverse, cette enzyme n'est pas exprimée dans les cellules HT-29 ou T84. Ces données démontrent que les lignées cancéreuses possèdent l'habilité de produire et libérer de l'ACh.

Parallèlement à l'augmentation de la production d'ACh, il est observé une diminution de sa dégradation. L'activité de l'AChE mesurée dans 55 échantillons issus de personnes saines et de patients atteints de cancers du côlon, du sigmoïde et du rectum, indique une diminution de l'activité de l'AChE dans les tissus cancéreux.

Ainsi, l'homéostasie du système cholinergique n'est pas conservée dans les cancers du côlon. La surexpression des M3 mAChRs est associée à une diminution de la dégradation et une augmentation de la synthèse de l'ACh. Les mécanismes sous-jacents et leurs conséquences demandent cependant à être clarifiés pour comprendre le rôle de la régulation du système cholinergique dans la tumorogenèse.

Rôle des récepteurs muscariniques

Pour étudier le rôle de M3 mAChR dans la tumorogenèse, l'équipe de Raufman a généré un modèle de souris *Apc* $^{-/+}$ déficient en récepteurs muscariniques M3 ($M3^{-/-}$). Contrairement aux souris sauvages qui expriment M1 et M3 mAChRs au niveau de la muqueuse gastrique (Xie, Drachenberg, Yamada, Wess, & Raufman, 2005), les souris $M3^{-/-}$ possèdent seulement le récepteur M1 mAChR (Raufman et al., 2008). La suppression génique des M3 mAChRs ne perturbe pas le développement gastro-intestinal. Les souris $M3^{-/-}$ sont maigres, hypophagiques avec un petit intestin légèrement plus long que celui des souris sauvages (Raufman et al., 2011). Pour autant, il n'y a pas de différence macroscopique entre les souris sauvages et les souris $M3^{-/-}$ (Raufman et al., 2008).

Pour mettre en évidence l'importance de M3 mAChR dans la tumorogenèse, Raufman et son équipe utilise des souris $M3^{-/-}$ traitées à l'AOM. Ils mettent en exergue que la suppression génique de ce récepteur conduit à la diminution du nombre de tumeurs ainsi que leur taille (Raufman 2008). Trois ans plus tard, ils utilisent le modèle de souris *Apc*$^{-/+}$ $M3^{-/-}$. Le nombre de tumeurs du petit intestin est réduit dans ce modèle comparé à *Apc*$^{-/+}$ $M3^{+/-}$ et *Apc*$^{-/+}$ $M3^{+/+}$. De plus le volume des tumeurs est diminué dans les souris *Apc*$^{-/+}$ $M3^{-/-}$. Seuls des adénomes de bas grades sont observés chez les souris *Apc*$^{-/+}$ $M3^{-/-}$ (Raufman 2011). A l'inverse, dans un modèle murin *Apc*$^{-/+}$ $M3^{+/+}$, il est observé des adénomes de bas et de haut grades (Boivin 2003). Ces résultats indiquent que l'expression de M3 mAChR joue un rôle important dans la promotion des tumeurs intestinales.

Prolifération, Invasion et migration

L'équipe de Cheng explore la possibilité que les cellules cancéreuses produisent de l'ACh qui promeut la prolifération cellulaire (Cheng 2008). Ils utilisent la lignée cancéreuse H508 dérivant d'adénocarcinome humain. Les cellules H508 possèdent le système de synthèse et de dégradation de l'ACh et expriment seulement les M3 mAChRs (2500 sites de liaisons/ cellule) (Frucht et al., 1999). L'utilisation des inhibiteurs d'AChE, l'eserine-hemisulfate et le *bis*-THA, conduit à une augmentation importante de la prolifération cellulaire. A l'inverse quand la synthèse et le transport de la choline sont inhibés, par l'hémicholinium-3, la prolifération est diminuée. Ces résultats mettent en évidence la production endogène d'ACh et sa libération. L'ACh agit comme un facteur de croissance autocrine. De plus, l'activation des récepteurs cholinergiques conduit à une augmentation de la perméabilité intestinale. En 2007, Cameron et *al.* démontrent pour la première fois que l'activation des récepteurs

cholinergiques augmente la perméabilité para-cellulaire au niveau du jéjunum murin. Cela est induit par la stimulation de M3 mAChR et par l'activation subséquente de la phospholipase A2 et la cyclooxygènase 2 (COX-2) (H L Cameron & Perdue, 2007). COX-2 est un représentant du lien entre l'inflammation et le cancer. En effet, l'augmentation anormale de l'expression de COX-2 est fréquemment observée dans divers cancers humains. La surexpression de COX-2 résulte de la mutation de p53. C'est le cas des lignées cellulaires cancéreuses HT-29 et Caco-2 où la protéine p53 est non-fonctionnelle (Greenhough et al., 2009). De nombreuses études suggèrent que l'expression de COX-2 est associée à l'induction et la progression des cancers du côlon, supprimant l'apoptose, induisant l'angiogenèse et promouvant l'invasion.

Les M3 mAChRs et COX-2 partagent la même cascade de signalisation, l'activation du récepteur muscarinique M3 est couplé à la phospholipase C (PLC) (Greenhough et al., 2009). PLC active la protéine PKC qui est un inducteur de COX-2. Dans les cellules HT-29, Yang et Frucht démontrent que la stimulation de M3 mAChR augmente l'expression de COX-2 de façon dépendante de la durée et de la dose. Cette augmentation est cependant abolie par l'utilisation d'antagoniste de M3 mAChR (W. L. Yang & Frucht, 2000).

La prostaglandine E2 (PGE2) est produite par l'activité de COX-2. Il est observé que l'induction de COX-2 par le carbachol engendre une augmentation de PGE2. Cette dernière agit de manière paracrine et/ou autocrine *via* les récepteurs EP4 portés par les cellules épithéliales. On note d'ailleurs une augmentation de l'expression de ces récepteurs dans les cellules épithéliales des CCR (Hawcroft, Ko, & Hull, 2007). Pai et *al*. mettent en évidence dans les cellules Caco-2 et HT-29 que la PGE2 induit l'incorporation de thymidine, un marqueur de la prolifération. Cela est permis par l'activation d'EP4 par PGE2. Cette croissance cellulaire est dépendante d'une augmentation d'AMPc, de l'activation de src, de la libération de TGFα et de la transactivation du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR). L'activation de l'EGFR est considérée comme un des protagonistes dans la carcinogenèse du côlon et fournit une cible thérapeutique potentielle (K. Cheng, Xie, & Raufman, 2007).

En effet, EGFR est communément surexprimé dans les tumeurs épithéliales. Ainsi dans les cancers du côlon, 25 à 77% des tumeurs expriment fortement l'EGFR comparés à la muqueuse adjacente saine (Salomon, Brandt, Ciardiello, & Normanno, 1995). La co-expression de M3 mAChR et de EGFR dans de nombreuses lignées cancéreuses et la

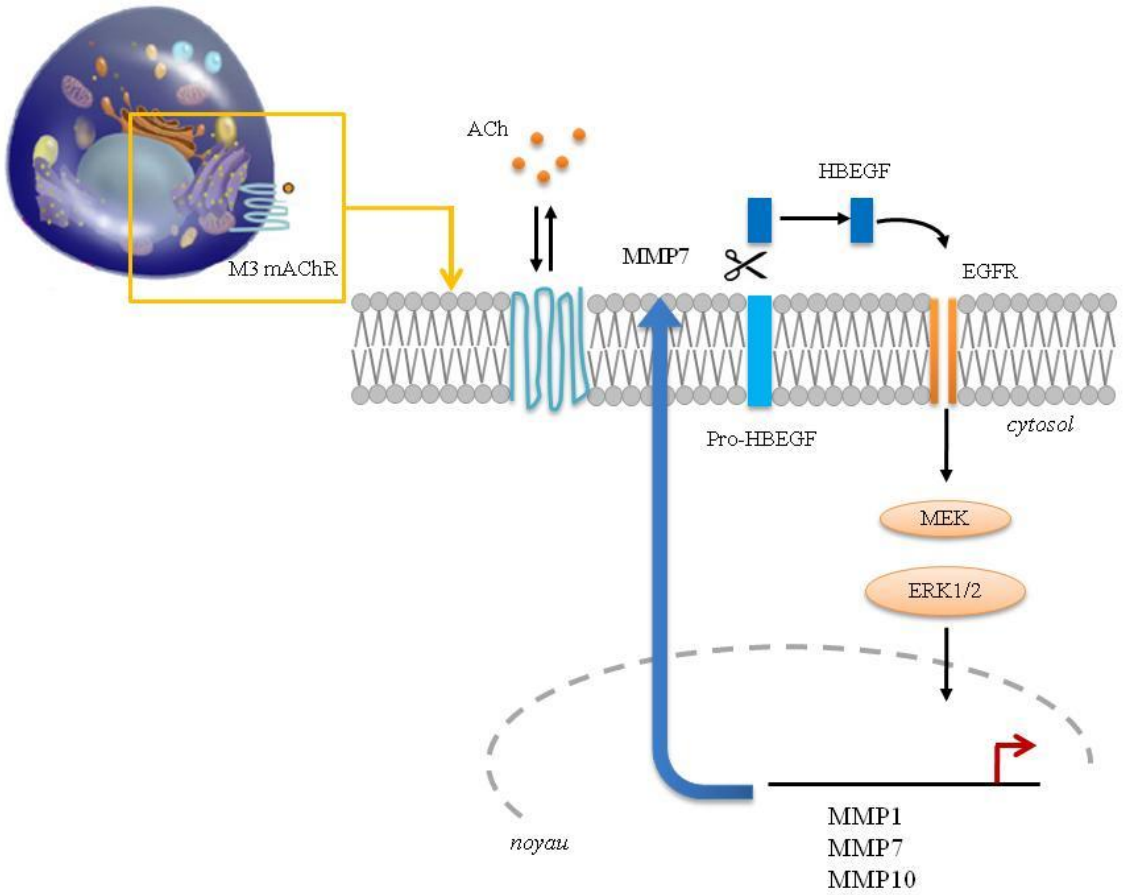


Figure 44. La signalisation sous-jacente à l'activation des M3 mAChRs.

L'interaction de M3 mAChR par l'ACh active la transcription et l'expression de MMP7. MMP7 catalyse le clivage de HBEGF, ligand d'EGFR. L'activation de ce récepteur induit la cascade de signalisation d'ERK qui stimule la transcription de MMP1, MMP7 et MMP10.
Les recherches de Xie mettent en évidence une boucle d'activation où l'augmentation de la transcription de MMP7 permet le clivage du pro-HBEGF.

D'après Xie, 2009

surexpression de ces récepteurs dans les cancers du côlon suggèrent que l'interaction entre M3 mAChR et EGFR est importante dans la régulation de la prolifération cellulaire dans le cancer du côlon (K. Cheng et al., 2003).

Dans les cellules H508, il a été montré que les M3 mAChRs stimulent l'expression des gènes des MMPs codant pour MMP1, MMP7 et MMP10. Ces dernières jouent un rôle dans la migration et l'invasion *in vitro* (Xie, Cheng, Shant, & Raufman, 2009). L'ACh induit l'augmentation transitoire de la transcription de MMP7 et augmente le temps de demi-vie des ARNm de cette MMP (Xie et al., 2009). La suppression génique de MMP7 dans un modèle murin $Apc^{-/+}$ atténue la formation tumorale (Wilson, Heppner, Labosky, Hogan, & Matrisian, 1997). Dans les cellules cancéreuses humaines, MMP7 permet la transactivation d'EGFR par la libération de HBEGF, un des sept ligands d'EGFR (K. Cheng et al., 2007). De plus, l'augmentation transcriptionnelle des MMPs est atténuée par un pré-traitement avec des inhibiteurs de M3 mAChR, d'EGFR et d'ERK (Xie et al., 2009).
A partir de ces résultats un modèle de l'interaction entre l'ACh et M3 mAChR a été établi (figure 44) : la liaison réversible d'ACh avec M3 mAChR conduit à l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de MMP7. MMP7 catalyse la rupture de pro-HBEGF et la libération d'EGFR. La voie de signalisation activée passe alors par ERK induisant la stimulation de nombreux gènes associés à la tumorogenèse (dont c-MYC, COX-2, cyclin D1). L'ACh stimule également la transcription de MMP1 et MMP10 par la même voie. Cependant, ces dernières non pas de rôle connu dans la prolifération des cellules H508 (Xie et al., 2009).

Effet anti-apoptotique

Les récepteurs couplés aux protéines G ont la capacité de contrôler l'apoptose, soit en initiant un effet pro-apoptotique soit en stimulant un effet anti-apoptotique selon le sous-type de récepteurs activés (Ueda et al., 2001). Budd et ses collègues étudient les propriétés anti-apoptotiques des mAChRs dans un modèle de cellule d'ovaire de hamster (CHO). En effet, ils ont montré que les récepteurs muscariniques couplés aux protéines $G_{q/11}$ (M1, M3, M5 mAChRs) possèdent un effet anti-apoptotique (Budd, McDonald, Emsley, Cain, & Tobin, 2003). Les mAChRs (plus particulièrement M3 mAChR) exprimés à la surface des cellules granulaires ou sur les cellules PC-12 protègent contre la mort par apoptose (Yan et al. 1995; Lindenboim et al. 1995). Le mécanisme par lequel les mAChRs atténuent l'apoptose n'est pas élucidé. Cependant, plusieurs études montrent que cela est permis par la voie phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (Murga, Laguinge, Wetzker, Cuadrado, & Gutkind, 1998)

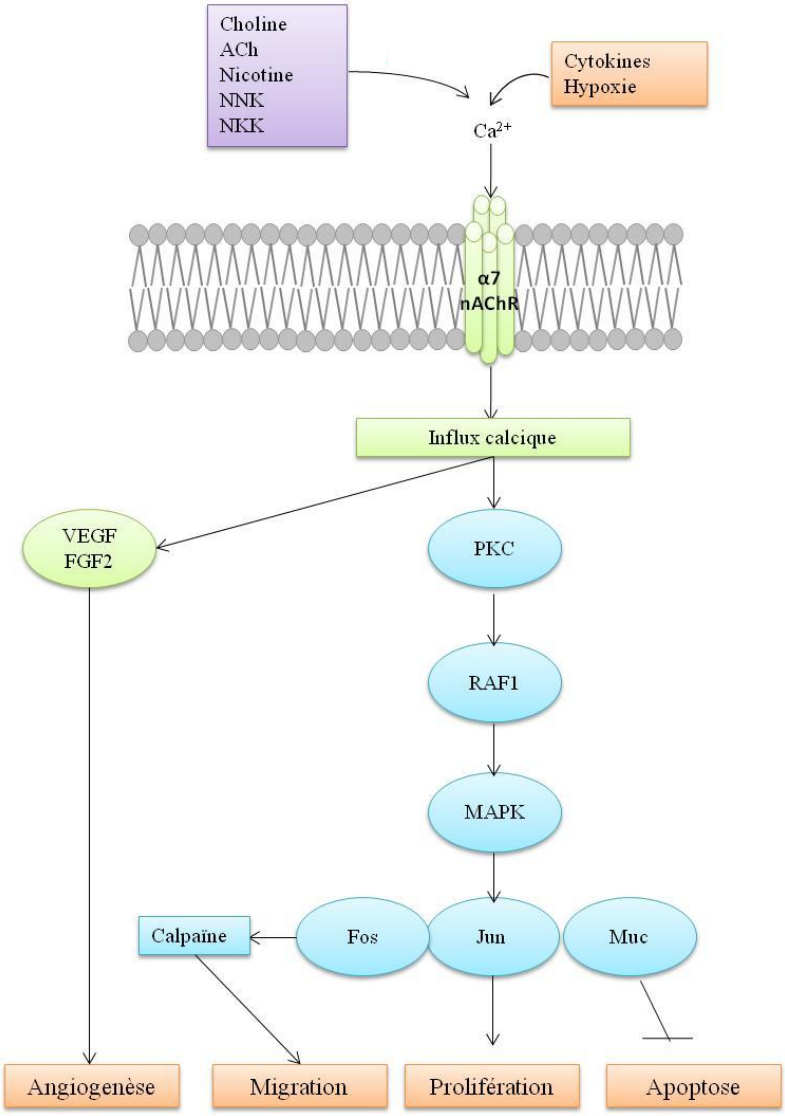


Figure 45. Rôle oncogénique des récepteurs nicotiniques lors d'une exposition chronique à leurs ligands.

Les agonistes nicotiniques activent α7 nAChR portés à la surface des cellules induisant un flux calcique. Cette augmentation calcique conduit à la libération de facteur de croissance autocrine tel que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ou fibroblastique (FGF2). Une seconde voie de signalisation est également stimulée : la cascade de PKC, RAF1 et MAPK. Cela conduit à la stimulation de la prolifération cellulaire, la migration, l'angiogenèse ainsi que l'inhibition de l'apoptose.
L'exposition chronique au 4-methulnitrosamine-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) ou au N-nitrosonornicotine (NNN) augmente l'expression d'α7 nAChRs, ainsi qu'un environnement cytokinique ou hypoxique.
D'après Hildegard, 2009.

et MAPK (Lindenboim et al., 1995; Yan et al., 1995) et Rho kinase (De Sarno, Shestopal, Zmijewska, & Jope, 2005).

Rôle oncogénique des récepteurs nicotiniques

Lorsque que la fumée de cigarette est inhalée plus de 7000 substances sont ingérées dans l'organisme. Soixante neuf de ces composés sont connus pour être cancérigènes (Russo, Nastrucci, Alzetta, & Szalai, 2011) dont deux sont des métabolites de la nicotine, le 4-methylnitrosamine-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) et le N-nitrosonornicotine (NNN) qui se lient au récepteur nicotinique (Schuller, 2009) (figure 45). NNK et NNN sont respectivement des agonistes d' α7 nAChR et d' αβ nAChR. De plus, leurs affinités pour les récepteurs nicotiniques sont respectivement 1300 et 5000 fois plus importantes que la nicotine.

Actuellement, aucune étude ne prouve l'aptitude de la nicotine ou de la cotinine à être des oncongènes *per se*. Cependant, certaines études mettent en exergue le rôle de la nicotine dans la promotion et la progression tumorale (Schuller, 2009).

En effet dans un modèle de souris A/J, ayant une susceptibilité à développer des cancers du poumon (Manenti et al., 1997), le traitement chronique à la nicotine induit des sarcomes. Ces résultats suggèrent le rôle de la nicotine dans les cancers (Galitovskiy, Chernyavsky, Edwards, & Grando, 2012) et plus particulièrement les métabolites NNK et NNN. De plus, l'exposition chronique au NNK conduit également à une augmentation du récepteur α7 nicotinique (Plummer, Sheppard, & Schuller, 2000).

Ainsi, il a été observé une hausse de l'expression d'α7 nAChR dans les cancers (Paleari et al., 2008). Cette augmentation corrèle avec une diminution de SLURP-1 qui est un modulateur allostérique de la voie de signalisation d'α7 nAChR. Il est considéré comme anti tumoral en permettant d'augmenter la réponse à l'ACh et de stimuler l'activité pro-apoptotique (Grando, 2008). De plus, il est observé une réduction du taux d'$\alpha_4\beta_2$ nAChR considéré comme un inhibiteur au développement et à la progression tumoral. En effet, ces récepteurs permettent la libération d'acide γ-aminobutyrique (GABA) qui bloque l'activité des récepteurs adrénergiques (Schuller, 2009) (figure 46).

La nicotine est une molécule angiogénique puissant à des concentrations tissulaires ou plasmatiques de 10^{-8} à 10^{-7} M (Heeschen et al., 2001) (tableau 15).

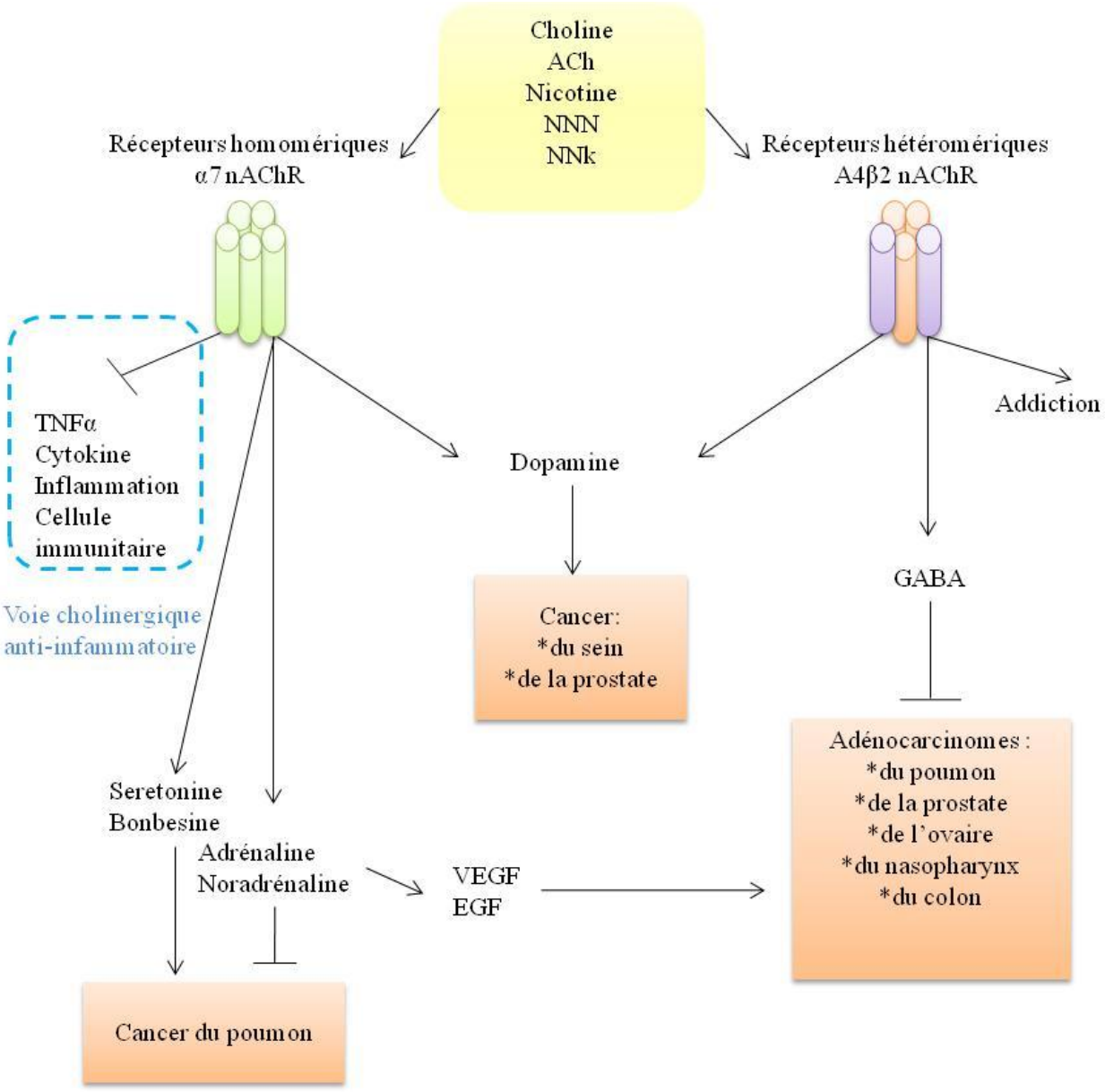


Figure 46. Les différentes fonctions des récepteurs α7 nAChR et α4β2.

Les récepteurs homomériques et hétéromériques stimulent la libération de la dopamine. Le récepteur α7 nAChR induit la libération de glutamate et de la sérotonine ainsi que les neurotransmetteurs du stress: l'adrénaline, la noradrénaline. En plus de réguler les fonctions cérébrales, ces agents stimulent la croissance de nombreux cancers.
Le récepteur α7 nAChR conduit également à l'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire. Le récepteur α4β2 stimule la libération d'acide aminobutyrique (GABA), suppresseur de tumeurs.
D'après Hildegard, 2009.

Pouvoir angiogénique

La nicotine conduit à l'angiogenèse et la croissance tumorale dans les cancers du poumon et du côlon. Il a été observé que lorsque des cellules cancéreuses sont implantées dans la membrane chorioallantoïque du poulet, la nicotine (1 µg/ jour) induit la génération de nouveaux vaisseaux. Cet effet est bloqué par l'utilisation d'antagonistes de nAChR (Mousa & Mousa, 2006). De plus, l'utilisation d'antagoniste d'α7 nAChR, MG624, atténue le processus angiogenique promu par la nicotine (Brown et al., 2012). Cependant, une réponse angiogénique résiduelle est toujours observée après la délétion génique d'α7 nAChR. Ces résultats mettent en exergue le rôle principal d'α7 nAChR dans le processus angiogénique ainsi que le rôle additionnel de certains nAChRs.

Dans un modèle de souris *nude* ayant subies une xénogreffe de cellules HT-29, il est observé une augmentation de la vascularisation de la tumeur *via* les récepteurs β-adrénergiques, COX-2, PGE2 et VEGF. L'ICI 118,551 est un antagoniste du récepteur adrénergique β2 qui bloque la croissance tumorale ainsi que l'expression de COX-2, PGE2 et VEGF.

Prolifération, invasion, migration

Les cellules HT-29 expriment les ARNm des sous-unités β1, α4, α5 et α7. Cependant pour former un récepteur fonctionnel, les sous-unités α4 et α5 nécessitent la présence de la sous-unité β (autre que β1 qui ne peut se combiner qu'avec α1, γ et δ). Ainsi seul les récepteurs α7 nAChR sont fonctionnels à la surface des cellules HT-29. Ces observations sont confirmées par Wong et *al.* (H P S Wong et al., 2007; Helen Pui Shan Wong et al., 2007) qui démontrent que l'administration de la nicotine (1 µM, 5h) conduit à l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la production d'adrénaline. Cette hausse est reversée par l'utilisation d'aténolol et d'ICI 118,551 suggérant le rôle des récepteurs β-adrénergiques dans ce processus prolifératif. Ainsi, la nicotine induit la prolifération des cellules cancéreuses par l'activation des β-adrenorecepteurs suivie des voies de signalisations PKC/ ERK1/ERK2/COX-2/PGE2 (Shin et al., 2004, 2005).

Effet anti-apoptotique

Maneckjee et Minna montrent que l'utilisation de nicotine ($10^{-2} \times 10^{-7}$ M) lève l'inhibition de la croissance cellulaire induit par les opioïdes (Maneckjee & Minna, 1990, 1994). Par la suite, différents laboratoires reportent l'habilité de la nicotine à conférer une résistance contre l'apoptose, induit par le stress extracellulaire et les agents anticancéreux (Zeidler, Albermann, & Lang, 2007). En effet, la nicotine inhibe l'effet apoptotique à travers divers mécanismes

Effets biologiques	[Nicotine] en M	Références
Augmentation de l'expression des nAChRs	10^{-7} à 10^{-6}	Gentry 2002; Yu 2009
Angiogenèse	10^{-14} à 10^{-6}	Cook 2004; Cook 2008; Dasgupta 2009; Dom 2010; Gnecchi 2008; Heeschen 2002; Park 2008; Villablanca 2008
Migration, invasion, métastase	10^{-8} à 10^{-6}	Dasgupta 2009; Ng 2007; Shin 2010; Xu 2006; Chernyavsky 2004; Zia 1999
Transition épithélio-mésenchymateuse	3,1. 10^{-8} à 10^{-6}	Dasgupta 2009; Roman 2004; Shin 2009; ZheNg 2007; ZhaNg 2007
Prolifération cellulaire	10^{-7} à 10^{-6}	Lin 2004; Arredondo 2005; Arredondo 2007
Cytotixicité cellulaire	> 10^{-6}	Zhang 2006; Chen 2010

Tableau 15. Effets biologiques de la nicotine sur plusieurs processus biologiques selon sa concentration.

dont Bax ou par la phosphorylation de Bcl-2, la hausse de NFκB, la prévention de la libération de cytochrome c, l'augmentation de suvivine et de XIAP.

Objectif de la thèse

Objectifs de la thèse

Mon projet de recherche s'inscrit dans la thématique de l'équipe du Stress et des Interactions Digestives dans laquelle j'ai débuté ma thèse et qui est dirigée par le Pr Bonaz. Cette équipe s'intéresse aux relations réciproques entre le système nerveux central et le tube digestif, avec un intérêt plus particulier pour l'axe du stress et plus particulièrement le CRF hypothalamique, principal neuromédiateur du stress. Cette recherche de nature biologique fonctionnelle et pharmacologique est alimentée par une problématique clinique représentée par les troubles fonctionnels digestifs, et notamment le syndrome de l'intestin irritable, la douleur viscérale et les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI), dans lesquels l'axe du stress occupe une place prépondérante.

Parmi ces pathologies, je me suis surtout focalisée sur les MICI qui comprennent la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn et touchent 1 français sur 1000. Elles débutent entre 15 et 30 ans et évoluent par poussées entrecoupées de rémissions de durée variable. Elles exposent peu à un risque vital mais altèrent fortement la qualité de vie des patients et augmentent le risque de développement de cancer colorectal. L'étiopathogénie des MICI est multifactorielle impliquant des facteurs immunologiques, génétiques, infectieux ou environnementaux. Parmi ces facteurs, le stress via le système CRFergique central et périphérique digestif, comprenant le CRF, les urocortines (Ucn1-2-3), et leurs récepteurs (CRF1,2), joue un rôle dans les poussées et/ou les rechutes de MICI. Le traitement médical des MICI n'est pas curatif mais uniquement suspensif et repose sur les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques comme les anti-TNFalpha (Rémicade®, Humira®). Ces traitements ne sont pas dénués d'effets secondaires (hématologiques, infectieux, lymphomes, auto-immunisation…), de résistances et posent des problèmes d'observance. Le nerf vague représente une composante majeure de l'axe neuro-endocrinien-immunitaire dont la finalité est d'assurer l'homéostasie de l'organisme. Il a des propriétés anti-inflammatoires, par sa composante afférente centrale (stimulation de l'axe corticotrope). Plus récemment, un rôle anti-inflammatoire de ses efférences périphériques, par un effet anti-TNF impliquant le récepteur α7nAchR des macrophages, a été mis en évidence. Une anomalie de la balance sympatho-vagale est observée au cours des MICI. La neurostimulation vagale (NSV) a montré son intérêt dans le traitement de l'épilepsie mais peu de données sont

disponibles dans le domaine de la pathologie inflammatoire digestive (expérimentale ou, à fortiori, clinique). Le laboratoire a mis au point un modèle de NSV chronique des efférences vagales à basse fréquence (5 Hz) chez le rat vigile et observé un effet anti-inflammatoire dans un modèle de colite expérimentale (Meregnani et al., 2011). L'étape suivante a été de proposer, la NSV comme traitement de la poussée ou d'entretien des MICI, notamment de la maladie de Crohn. Par comparaison au traitement anti-TNF, la NSV a l'avantage de son coût, de sa bonne tolérance et nous prémunit également des problèmes d'observance observés chez ces patients. Cette activité est poursuivit par l'équipe du Pr. Bonaz qui dispose à l'heure actuelle de 6 patients dans son protocole clinique.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a surtout concerné les aspects moléculaires et s'est orienté autour de deux axes :

I- L'étude du rôle du système CRFergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

II- L'étude du rôle de la voie cholinergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

En effet ses deux systèmes CRfergique et cholinergique, ont été bien décrit au niveau central mais il existe très peu de donner sur leur expression, régulation et fonction au niveau des cellules épithéliales.

Axe I- Etude du rôle du système CRFergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Ce travail a été initié par B. Ducarouge, étudiant en thèse au laboratoire. J'ai participé à ce travail comme collaboratrice.

1- Etude du rôle de l'Ucn3 et de la signalisation CRF2 dans la différenciation des cellules épithéliales.

2- Etude de l'implication du CRF2 dans la modulation des propriétés d'adhérence cellulaire et la migration des cellules de cancer colorectal ***(Article 1)***.

CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. B. Ducarouge, M. Pelissier-Rota, M. Laine, N. Cristina, Y. Vachez, J-Y Scoazec, B.Bonaz, and M. Jacquier-Sarlin. Plos One 2013, 8 :79335-49.

Axe II- Etude du rôle de la voie cholinergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Cette partie constitue le cœur de mon travail de thèse.

1- Etude du rôle des récepteurs cholinergique dans cancers colorectaux : potentien thérapeutique de la VNS ? ***(Article 2)***.

"Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer: Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation?" M. Pelissier-Rota, M. Lainé, B. Ducarouge, B. Bonaz and M. Jacquier-Sarlin. (Publié dans *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 1116-1131.)

2- Etude du mécanisme responsable de l'effet protecteur des récepteurs nicotiniques dans ces cellules de carcinomes coliques ***(Article 3)***.

"Nicotine-induced cellular stresses and autophagy in human cancer colon cells: a supportive effect on cell homeostasis via up-regulation of Cox-2 and PGE_2 production." M. Pelissier-Rota, L. Pelosi, P. Meresse and M R. Jacquier-Sarlin. (Soumis à *Biochemical Journal*).

3- Etude du mécanisme responsable de l'effet pro-tumoral des récepteurs muscariniques ***(Article 4)***.

"Crosstalk between muscarinic and CRF2 receptors to regulate cellular adhesion properties of human colon cancer cells." M. Pelissier-Rota, N. Chartier and M.R. Jacquier-Sarlin. (Soumis à *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*).

.

***Autres travaux réalisés pendant la thèse* :**

Annexe I- Travail de synthèse sur la culture des cellules épithéliales.

Chapitre du livre : ***"Culture de cellules animales – 3e édition"*** édité par Lavoisier. **Chapitre 27.** Système intestinal - B. Ducarouge, M. Pelissier-Rota, M. Rolli-Derkinderen, B. Lardeux, M. Lainé, M. Neunlist et M. Jacquier-Sarlin (2014).

Annexe II- Travail de synthèse sur la régulation des jonctions adhérentes : implication dans la différenciation cellulaire et le développement tumoral.

Chapitre du livre : ***« Intercellular Communication in Cancer"*** qui sera publié par Springer Publishing. « Dynamic regulation of adherens junctions : implicatio in cell differentiation and tumor developpement ». M. Pelissier-Rota, N. Chartier and M. Jacquier-Sarlin (2014, sous presse).

Axe I

Etude du rôle de la voie cholinergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Présentation du travail

Les systèmes d'adhérence et la fonction de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est constamment exposé à de multiples stimulations antigéniques d'origine alimentaire ou pathogénique provenant de l'environnement extérieur, et constitue donc une barrière physique et immunologique pour l'organisme. La structure de l'épithélium est assurée par divers systèmes de jonctions cellule-MEC et cellule-cellule, qui mettent en jeu des protéines transmembranaires et des protéines intracellulaires structurales et régulatrices.

Une des fonctions essentielles de l'épithélium intestinale est de maintenir l'intégrité des tissus tout en régulant la perméabilité intestinale. Cette fonction dépend de l'expression coordonnée et de l'assemblage de protéines en jonctions intercellulaires, incluant les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées situées au niveau de la membrane entre les régions apicales et latérales des cellules épithéliales polarisées, contrôlent le transport paracellulaire sélectif de certaines molécules et d'ions , elles restreignent les mouvements latéraux des protéines membranaires régulant ainsi la *perméabilité de l'épithélium*. Cette perméabilité va être influencée par l'organisation du cytosquelette d'actine, la composition et le nombre de jonctions serrées constituant la plaque d'adhérence. Ces paramètres sont sous le contrôle de facteurs intrinsèques et extrinsèques comme les toxines bactériennes, les nutriments, les cytokines et les facteurs de croissance.

L'équilibre entre la protection de l'hôte contre les infections et le maintien de la flore intestinale, il est assuré par un système immunitaire qui a développé des artifices (expression des molécules d'adhérence : ZO-1, cadhérines à la surface de certaines cellules immunitaires) permettant aux cellules immunitaires de s'intercaler entre les cellules épithéliales tout en maintenant l'intégrité de la barrière par le biais de complexes d'adhérence. Lorsque cette homéostasie est rompue, comme cela est observé dans les MICI, la perméabilité épithéliale est altérée, les pathogènes viennent stimuler le système immunitaire muqueux et favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires favorisant le développement de maladies inflammatoires de l'intestin. Les complexes d'adhérences sont également la cible des

pathogènes qui vont : dégrader (sécrétion de protéases) les récepteurs transmembranaires tels que les cadhérines, détourner le cytosquelette d'actine à leur profit ou modifier l'état d'activation de protéines régulatrices comme les protéines G monomériques (pour revue (Vogelmann, Amieva, Falkow, & Nelson, 2004)).

Les maladies inflammatoires de l'intestin et l'adhérence cellulaire

L'étiopathogénie des MICI est multifactorielle impliquant des facteurs immunologiques, génétiques, infectieux ou environnementaux. Ces pathologies se caractérisent par une inflammation de la muqueuse, des défauts dans la production de mucus (ulcération) et des altérations dans la structure de l'épithélium qui augmentent la perméabilité de la barrière épithéliale. Ces observations cliniques sont associées à des modifications du profil d'expression des molécules d'adhérences (intégrines, cadhérines et claudines) et des isoformes de laminines, protéine majeure de la lame basale, le long de l'axe crypte-villus. Des mécanismes de réparation conduisant à la restructuration de l'épithélium sont immédiatement induits après ulcération de la muqueuse gastro-intestinale. Ils consistent en la migration des cellules en marge de la zone ulcérée qui vont venir recouvrir la partie dénudée et rétablir la continuité de l'épithélium. Durant cette étape, il n'y a pas de prolifération cellulaire. C'est seulement ultérieurement, que les processus de prolifération et de différenciation cellulaire vont participer à la restauration de l'architecture normale des villi et des fonctions d'absorption/sécrétion. Les processus de migration qui accompagnent la restructuration de l'épithélium sont associés à des changements dans l'expression de la E-cadhérine et des caténines, et dans l'adhérence cellules-cellules et cellules-MEC. Ces changements sont variables selon la zone concernée: on observe une surexpression des molécules d'adhérences dans la zone inflammatoire active et une diminution dans l'épithélium en cours de restructuration. Il y a absence d'expression de ces molécules dans la zone ulcérée. Par ailleurs, lors d'une inflammation l'épithélium est composé d'entérocytes moins différenciés.

Le stress dans les maladies inflammatoires de l'intestin

S'il est indubitable, que les MICI sont associées à une augmentation de la perméabilité intestinale, le débat persiste pour savoir si ces défauts de la barrière intestinale sont à l'origine du développement de ces pathologies ou une conséquence d'une réponse immune ou inflammatoire préexistante (bactéries ou toxines bactériennes).

Ce qui est plus troublant c'est la corrélation qui existe entre les conditions de vie stressante et l'apparition ou la récidive de maladies inflammatoires digestives. Des travaux

effectués chez l'animal montrent que des épisodes de vie stressante (chronique ou aiguë) augmentent la perméabilité intestinale et le nombre de bactéries attachées sur l'épithélium ou le pénétrant. Ces observations qui sont également associées à des modifications de la structure des mitochondries, sont retrouvées chez les patients atteints de MICI. Ces défauts sont le résultat d'anomalies du transport trans- et para-cellulaire et impliquent les fibres nerveuses cholinergiques, les mastocytes et le CRF démontrant qu'il existe un axe neuro-digestif capable de contrôler la réponse inflammatoire. Des travaux récents ont apporté de solides arguments pour une relation entre stress et l'évolution des MICI avec la démonstration parallèle d'un effet pro-inflammatoire du stress au niveau du tube digestif. Chez le rat, un stress de contention augmente la sévérité des lésions colo-rectales chimiquement induites par l'administration intra-rectale de TNBS (Collins, 2001; Mawdsley & Rampton, 2006; Melgar, Engström, Jägervall, & Martinez, 2008; . De même, plusieurs travaux ont décrit la réactivation d'une colite expérimentale, après sa guérison complète, sous l'effet d'un stress psychologique (Qiu, Vallance, Blennerhassett, & Collins, 1999; Collins, S.M., et al., Gastroenterology, 1996). La survenue d'évènements de vie dits "stressants" dans la période précédant la survenue d'une poussée inflammatoire est une observation courante, en pratique clinique, chez les sujets atteints de MICI (Duffy, L.C., et al.,1991). Levenstein et coll. (1994) ont établi une association entre des indices psychosociaux et l'activité de la maladie au cours de la RCH. Les stress répétés, plus que les stress aigus, seraient plus particulièrement impliqués. Une étude cas-témoins récente, menée au sein du registre EPIMAD du nord-ouest de la France et basée sur les cas incidents de MICI, vient de révéler la particulière fréquence avec laquelle des événements de vie étaient observés avant le déclenchement d'une MC ; cette conclusion n'était pas extrapolable à la RCH dans cette étude (Gue, M., et al, 1997). Enfin, très récemment une revue de la littérature (méta-analyse) retient le stress comme impliqué dans la physio-pathologie des MICI et une autre étude montre que, par comparaison à des sujets témoins, des patients en rémission de leur MICI soumis à un stress ont des modifications hormonales (cortisolémie, ACTH sanguine), hémodynamiques et tissulaires plus marquées (Farhadi, A., et al, 2005, Maunder, R.G.2005)

Si plusieurs travaux suggèrent que le stress contribue à l'initiation ou à l'aggravation des symptômes inflammatoires observés dans les MICI, le mécanisme responsable et les voies de signalisation mises en jeu sont encore très mal connus. Les peptides regroupés sous le non de CRF et urocortines (1 à 3) appartiennent à une famille de neuropeptides produits par le cerveau ; ils constituent les principaux neuromédiateurs du stress et agissent sur les récepteurs

spécifiques : CRF1 et le CRF2. Le CRF et les urocortines sont également retrouvés en périphérie, et notamment dans le tube digestif. Ils peuvent être des acteurs importants de la réponse au stress dans le cadre des MICI, grâce à leur capacité à réguler la réponse inflammatoire. D'aute part, l'expression des molécules impliquées dans la signalisation du système CRFergique est augmentée lors des poussées inflammatoires : l'expression de l'Ucn2 et du CRF2 a été identifiée au niveau des cellules du côlon des patients RCH et MC (Moss et al., 2007).

Différents mécanismes sont responsables des dysfonctions de la barrière épithéliale induites par le système CRFergique qui pourrait agir *via* le système nerveux, les cellules immunitaires et/ou les cellules épithéliales. Plusieurs études ont ainsi montré que le CRF2 jouerait un rôle pro-inflammatoire au niveau du colon en modulant l'activité des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. ***Nos travaux de recherche se concentrent sur un aspect peu étudié du système CRFergique, qui concerne les cellules épithéliales.***

Notre projet consiste à déterminer :

1) Si le système CRFErgique est exprimé au niveau des cellules épithéliales et comment il est régulé. Nous focaliserons notre étude sur le CRF2 et son ligand UCn3 qui ont été décrits pour avoir un rôle pro-inflammatoire.

2) Par quel(s) mécanisme(s) le système CRFergique agit sur l'homéostasie intestinale :
- Effet sur la perméabilité intestinal
- Effet sur la différenciation entérocytaire.

3) De caractériser le lien potentiel entre système CRFergique périphérique et CCR afin d'utiliser la balance CRF1/CRF2 comme marqueur d'évolution de la colite ou de CCR.

Lignées d'adénocarcinomes coliques	Différenciation	Propriétés
HT-29	Possible si: *carence en glucose *présence de butyrate de sodium *sous l'action de drogues anti-cancéreuses	Populations hétérogènes composées de : -cellules indifférenciées poussant en multicouches -cellules présentant des critères de différenciation: *cellules sécrétant du mucus *cellules avec bordure en brosse *cellules polarisées autour de la lumière interne de la multicouche avec ou non une bordure en brosse
Caco-2	*spontanée à confluence *induite par culture sur matrice extra-cellulaire	Cellules qui poussent en monocouche de cellules polarisées et expression des protéines associées au métabolisme gluco-lipidiques des entérocytes
T84 ou HC84S	Pas de caractéristique de différenciation les rapprochant d'un type cellulaire du tissu épithélial intestinal	A confluence ces cellules forment une monocouche de cellules polarisées: -absence de bordure en brosse -absence de sécrétion de mucus -résistance trans-épithélial élévée quand elles sont cultivées sur colloagène de type I
SW480	Très faible en culture	Cellules polyploïdes qui présentent de rares villosités
LS-174T	Peu différenciées	Cellules non polarisées présentant une faible cohésion: -absence de E-cadhérine -pas de mutation du gène APC
HCT-8	Morphologie épithéliale	Cellules qui expriment la phosphatase alcaline et de la kératine

Tableau 16. Différenciation et caractéristiques phénotypiques de modèles cellulaires.

Matériels et Méthodes

1) Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture

La première lignée de carcinome colique humaine, HT-29, a été établie en 1964 par Jorgen Fogh. En 1977, 127 lignées cellulaires furent dérivées à partir de cancers colorectaux humains (Fogh, Fogh, & Orfeo, 1977). Comme la tumeur d'origine, ces lignées cellulaires varient beaucoup dans leur stade de différenciation, dans leur pouvoir prolifératif ou dans leurs propriétés métaboliques. Les principales lignées utilisées sont répertoriées dans le tableau 16.

Dans des conditions de culture standard, la plupart des lignées cellulaires sont incapables de se différencier. Toutefois, dans des conditions de culture particulières, certaines de ces lignées, les Caco-2, les HT-29 ou les T84, peuvent adopter un phénotype d'entérocytes ou de cellules à mucus (Chantret, Barbat, Dussaulx, Brattain, & Zweibaum, 1988; Sääf et al., 2007). Ces lignées constituent des modèles d'étude *in vitro* qui permettent de caractériser les mécanismes impliqués dans la mise en place de la barrière épithéliale et ceux conduisant à son altération lors de processus pathologiques comme les MICI.

- La lignée Caco-2

Les cellules Caco-2 se différencient spontanément vers un phénotype entérocytaire dès la confluence des cellules en culture (Pinto, Rabine-leon, Appay, Kedinger, & Zweibaum, 1983). Ainsi aux stades précoces de culture, les cellules sont indifférenciées alors que 20 à 40 jours après la confluence, elles forment une monocouche de cellules polarisées avec des microvillosités apicales et établissent des contacts intercellulaires comme des jonctions serrées. Contrairement aux cellules coloniques humaines, les Caco-2 différenciées expriment des enzymes normalement présentent dans les villosités de l'intestin grêle comme des disaccharidases ou des peptidases (Beaulieu & Quaroni, 1991; Hauri, Roth, Sterchi, & Lentze, 1985; Vachon & Beaulieu, 1992).
Elles assurent également le transport ionique et le transport de l'eau au niveau de la membrane basolatérale, formant des dômes en culture (Pinto et al., 1983). Environ 36 clones ont été isolés à différents passages de la lignée parentale dans le but d'isoler des populations plus homogènes avec un meilleur potentiel de différenciation entérocytaire. Ils diffèrent

surtout pour leur taux de sucrase-isomaltase et pour la consommation de glucose. Les deux clones les plus utilisés sont les Caco-2/TC7 et les Caco-2/15, les cellules TC7 exprimant le plus fort taux de sucrase-isomaltase (Chantret et al., 1994). Toutes ces propriétés font de la lignée Caco-2 un outil précieux pour l'étude des événements moléculaires associés à la polarité cellulaire, la biogénèse enzymatique et au transport de molécules. Cependant bien qu'elles ressemblent à des entérocytes, ces cellules sont malignes et présentent des mutations sur plusieurs gènes comme p53, APC, β-caténine et smad (Gayet et al., 2001).

- La lignée HT-29

L'intérêt des cellules HT-29 réside dans le fait que, selon les conditions de culture, on peut dériver des sous-populations et des clones cellulaires correspondant à différents phénotypes : des cellules absorbantes (entérocytes du côlon) ou des cellules sécrétrices de mucus (cellules de gobelet). Contrairement aux cellules Caco-2, la lignée d'adénocarcinome colique HT-29 est considérée comme une lignée pluripotente. Dans les conditions de culture standard (glucose et SVF), les cellules HT-29 conservent un phénotype indifférencié.
Elles se développent sous forme de multicouches de cellules non polarisées et n'expriment pas de marqueurs fonctionnels des cellules épithéliales.
Cependant, lorsque les conditions de culture sont modifées ou en présence d'inducteurs de la différenciation, elles adoptent un phénotype de cellules épithéliales intestinales différenciées. Par exemple, une carence métabolique (carence en glucose ou en glutamine) ou l'utilisation d'une autre source de carbone (substitution du glucose par du galactose, utilisation d'inosine ou d'uridine) conduisent à une différenciation de la lignée parentale HT-29 vers le phénotype « côlonocytes ». Elles expriment certaines enzymes des bordures en brosse, mais avec des activités beaucoup plus faibles que celles des cellules de l'intestin grêle ou des Caco-2 dont la différenciation est plus proche des entérocytes (Lenaerts, Bouwman, Lamers, Renes, & Mariman, 2007; Pinto et al., 1983).
Elles se caractérisent aussi par la formation de dômes et de bordures en brosse plus ou moins denses et riches en villine; le traitement de la lignée parentale par le butyrate de sodium (BtNa) a permis d'enrichir une population mixte – de cellules absorbantes et de cellules sécrétrices de mucus – et d'isoler à plus forte concentration de BtNa un clone sécréteur de mucus – le clone HT-29/16E (Augeron & Laboisse, 1984). L'utilisation de substances anticancéreuses permet aussi la différenciation des cellules HT-29.

En présence de méthotrexate (MTX, 10^{-7} M), elles forment une population mixte de cellules absorbantes ou cellules de Gobelet. À des concentrations plus fortes (10^{-5} à 10^{-6} M), elles forment uniquement des cellules caliciformes sécrétant des mucines gastriques (Lesuffleur, Barbat, Dussaulx, & Zweibaum, 1990). Cependant, l'utilisation d'une concentration de MTX comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} M entraîne en changement de différenciation de la forme muco-sécrétrice au phénotype absorbant. Ce changement coïncide avec une forte amplification du gène codant pour une enzyme cible du MTX, la dihydrofolate réductase (Lesuffleur et al., 1991).

De la même façon, l'adaptation des cellules HT-29 au 5-fluoro-uracile (5-FU) conduit à l'émergence d'une population mixte : de cellules polarisées formant des dômes et des cellules de Gobelet qui sécrètent des mucines côloniques. La résistance au 5-FU est associée à l'amplification du gène de la thymidylate synthétase (Lesuffleur et al., 1991).

2) La culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'adénocarcinomes coliques HT-29, Caco-2/TC-7 sont cultivées en milieu « Dulbecco Minimal Essential Medium » (DMEN) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant 25 mM de glucose et supplémenté en sérum de veau foetal (SVF) (10%), et en pénicilline/streptamycine. L'incubateur est maintenu à 37°c dans une atmosphère à 5% de CO_2.

La lignée cellulaire HT-29 CRF2-GFP où le CRF2 humain est fusionné avec la GPF a été obtenue par infection virale. Le CRF2 humain a été cloné dans le vecteur d'expression pBabe (pour plus de détail (Chartier et al., 2011)). Les cellules CRF2-GFP sont sélectionnées par l'ajout de 2 µg/ml de puromycine (BD Biosciences) dans un milieu DMEN 10% SVF puis par cytométrie en flux selon leur taux de fluorescence (GFP).

La différenciation des cellules HT-29 confluentes est induite par la privation en glucose substitué par du galactose dans le milieu de culture. La culture est maintenue pendant 10 jours post-confluence. Le milieu est changé tous les jours.

Les cellules Caco-2 se différencient spontanément vers un phénotype entérocytaire dès la confluence des cellules en culture (Pinto, Rabine-leon, Appay, Kedinger, & Zweibaum, 1983). Ainsi 21 jours après la confluence, elles forment une monocouche de cellules polarisées avec des microvillosités apicales et établissent des contacts intercellulaires comme des jonctions serrées.

Les cellules peuvent être soumises à deux types de stress :

Un stress aigu (noté « U » pour unique) : les cellules HT-29 ou Caco-2 sont différenciées dans le milieu de culture adéquat. La nuit précédant la récupération des cellules (soit la nuit entre les jours 14-15 et 20-21), elles sont incubées dans du milieu de culture privé de SVF. Au jour 15 (noté 15 U5) ou 21 (noté 21 U5), les cellules sont incubées pendant 5 heures avec l'Ucn3 (100 nM).

Un stress chronique (noté « chron » pour chronique) : pendant 15 ou 21 jours, les cellules HT-29 ou Caco-2 sont incubées dans le milieu de différenciation adéquat auquel est additionné de l'Ucn3 (100 nM). L'Ucn 3 est ajouté dans le milieu de culture et est renouvelé tous les deux jours en même temps que le milieu de culture.

3) Séparation des membranes sur gradient de saccharose

Les radeaux lipidiques sont isolés à partir d'un gradient discontinu de saccharose 40%-35%-5%.

Les cellules HT-29 CRF2-GFP sont ensemencées (3 dans des boîtes de culture Ø 10 cm/ condition). Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont récupérées à 4°C par grattage dans un tampon 50 mM HEPES/ 150 mM NaCl/ 5 mM EGTA/ pH 7,4 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (ROCHE).

Les lysats sont incubés avec 1% de Triton X-100 pendant 1h à 4°C.

Après 10 min de centrifugation à 2500g, les surnageants sont gardés puis mélangés (à volume équivalent) avec une solution à 80% de saccharose. Ils sont déposés de bas en haut dans des tubes 12mL à utracentrifugation, 3mL du lysat à 40% saccharose final, 5mL de solution à 35% puis 3mL de celle à 5%. Toutes les solutions de saccharose sont diluées dans le tampon de lyse. Les tubes sont placés dans un rotor Beckman SW-41 pour 19h de centrifugation à 100000g à 4°C.

Les gradients sont prélevés par le haut en fractions de 1mL sur 12 fractions. Les fractions sont ensuite regroupées 2 par 2.

Un volume équivalent (des fractions obtenues) est déposé sur gel polyacrylamide pour analyser l'expression protéique par westernblot.

Anticorps primaires	**Provenance**	**Fournisseurs**	**Dilution (WB; IF)**
Villine			1/1000
CRF2	Lapin	Abcam	1/1000
DPPIV	Lapin	Biomole	1/1000
Klf4	Lapin		
Flotilline			1/1000
E-cadhérine HECD1	Lapin	Takara Biochemicals	1/1000; 1/100
p120ctn clone 98	Souris	BD	/; 1/100
Actine	Lapin	Sigma	1/2000
Anticorps secondaires	**Provenance**	**Fournisseurs**	**Dilution (WB; IF)**
Anti-lapin HRD	Âne	Jackson	1/20000; /
Anti-souris HRP	Chèvre	Bio-rad	1/3000; /
Anti-lapin Alexa Fluoro 546	Chèvre	Invitrogen	/; 1/500
Anti-souris Alexa fluoro 488	Chèvre	Invitrogen	/; 1/500

Tableau 17. Anticorps utilisés

4) Western blot

Préparation des échantillons

Les cellules épithéliales du côlon proximal de rat Sprague-Dawley ont été prélevées : après lavage de la muqueuse du côlon avec du PBS froid, des pièces de 0,5 cm sur 0,5 cm sont découpées dans le côlon proximal et mises sous agitation pendant 45 minutes dans du tampon de dissociation PBS/ 1 mM EDTA/ 1 mM DTT. La fraction enrichie en cellules épithéliales est ensuite récupérée après sédimentation des pièces découpées puis centrifugées 45 minutes à 1500 rpm. Les culots sont repris dans un tampon RIPA avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche).

Les cellules Caco-2 différenciées sont lysées, 10 min à 4°C, soit en tampon RIPA supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases soit en tampon Laemmli (300µL pour environ 10^6 cellules).

Pour les cellules épithéliales intestinales de rat ou les cellules Caco-2, les membranes cellulaires sont cassées par sonication 30 secondes à 400 joules/watt.sec en chambre froide et la concentration protéique des échantillons est déterminée par un dosage « microBCA ».

Electrophorèse et Western blot

Les protéines, à raison de 30 µg en tampon Laemmli, sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide (12%) et transférées sur membrane de PVDF (GE Healthcare).

Les membranes sont saturées dans du TBS, 0,1% Tween 20, 5% lait pendant 2h à 20°C, incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation, puis lavées trois fois au TBS, 0,1% Tween 20. Les membranes sont alors incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase avant d'être à nouveau lavées. Les anticorps sont répertoriés dans le tableau 17.

Les protéines d'intérêt sont ensuite détectées par chemioluminescence (Pierce) puis révélées sur hyperfilm ECL (GE Healthcare) et quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel Image J (NIH). L'expression protéique est normalisée par rapport à celle de l'actine.

5) Immunofluorescence

Les côlons de rat Sprague-Dawley sont récupérés puis lavés au PBS à 4°C puis fixés en tampon PFA sur la nuit et cryo-protégés par une incubation en PBS , 30% saccharaose. Les tissus sont alors inclus en OCT et coupés au cryostat à 10 µm d'épaisseur.

Gene	Séquences	Longueur	Tm en°c	Nombre de cycles
GAPDH	5’- TCCTCCTGCGACAGTCA-3’ 5’- CACCACCTTCTTGATGTCATC-3’	350	60	30
DPPIV	5’-CCCGCGGCGCCTTTATAC-3’ 5’-GTGGTAAGACGGAGCCTGAC	446	62	30

Tableau 18. Amorces utilisées lors des RT-PCR.

Les cellules sont ensemencé à $2{,}510^5$ cellules/ puits et cultivées et traitées sur lamelles en verre.

Les cellules et les tissus sont fixées avec du tampon PFA puis perméabilisées pendant 15 min à 20°C avec du PBS, 0,5% Triton X-100. La saturation est effectuée avec du TBS tween 0,05%, BSA 3% à 37°C, pendant 1h. Les lamelles sont alors successivement incubées pendant 1h avec les anticorps primaires, 45 min avec les anticorps secondaires fluorescents. Chaque incubation avec les solutions d'anticorps est suivie de 3 lavages en TBS-Tween 0,05%. Le noyau des cellules est marqué avec du TO-PRO3 (Invitrogen) pendant 5 minutes avant le dernier lavage en PBS. Les lamelles sont montées sur des lames en verre dans du milieu de montage (Dako) puis analysées par microscopie confocale (objectif x100).

6) RT-PCR

L'ARN total est effectué par kit Nucleospin (Macherey-Nagel) suivant les instructions du constructeur. Après le dosage de l'ARN par lecture au spectrophotomètre à 260nm (1DO= 40µg/mL), 2µg d'échantillons sont soumis à une reverse transcription avec la M-MLV (27032-INTR, Euromedex). La qualité de ces ARNs est également évaluée par migration sur gel d'agarose 2% et identification des ARNs ribosomaux (28S et 18S). Les PCR ont été réalisées avec un kit Taq (Euromedex EUA00103) selon le nombre de cycles et Tm indiqués dans le tableau 18. Cependant, à l'aide d'un thermocycler (Eppendorff) les échantillons subissent une dénaturation pendant 10 minutes à 92°c puis un nombre de cycles comprenant une minute à 95°C (dénaturation), 2 minutes à Tm, 1 min à 72°C. Enfin les échantillons sont incubés 10 minutes à 72°c. La GAPDH est utilisé comme référence interne.

Les produits d'amplification sont analysés par migration sur gel d'agarose 1%. La quantification est permise par Image J (NIH software).

7) Mesure de la perméabilité intestinale

a) Mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER)

La TEER est un marqueur de l'intégrité de l'épithélium intestinal. Les cellules HT-29 et Caco-2 sont ensemencées à une densité de 5.10^5 cellules en inserts de 14 mm de diamètre aux pores de 0,4µm (Corning PET). Après trois jours, les cellules ont atteint la confluence. Elles sont ensuite différenciées durant 10 jours dans le milieu DMEN dépourvu de glucose mais supplémenté en galactose (DMEN Gal) pour les HT-29 et durant 21 jours dans un milieu

DMEN pour les Caco-2. La veille des mesures, les cellules sont privées de SVF. La TEER est mesurée avec un volt-ohmmètre Millicell (Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France) en Ω.cm² lors d'un traitement à l'Ucn3 (100 nM, 4 heures) ou en absence de traitement. Les cellules peuvent également avoir été prétraitées pendant une nuit (ON) avec de l'astressin 2B (1 µM), antagoniste du CRF2, permettant de mettre en évidence le rôle du CRF2 dans l'altération de la perméabilité intestinale.
Le bruit de fond est obtenu par mesure des puits contenant des inserts sans cellule et du milieu.
Les expériences de TEER sont réalisées trois fois.

b) Mesure du passage de dextran-FITC

Les cellules HT-29 sont différenciées sur inserts comme pour la TEER. Après traitement (Ucn3, 100nM, 5 heures) ou dans des conditions contrôles, le dextran-FITC (4 KDa) (Sigma) est ajouté dans le compartiment apical (concentration finale de 2,2 mg/ml). A 10, 20, 30 et 40 minutes, la quantité de fluorescence est mesurée dans le compartiment basal avec un fluorimètre lecteur de microplaque aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission suivantes : 485-520 nm. Le bruit de fond est obtenu par la mesure de l'auto-fluorescence du milieu de culture.
Les expériences du passage de dextran-FITC sont réalisées trois fois.

8) Mesure d'activité enzymatique

a) Activité phosphatase alcaline

Les cellules sont lysées dans un tampon Na_2SO_4 5 mM / TRIS-HCl pH 7.4 1 mM supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les cellules sont ensuite raclées et les membranes cellulaires sont cassées par sonication, 30 secondes à 400 joules/watt.sec en chambre froide.

L'activité de la PA endogène est testée en plaque 96 puits avec 1, 5 et 10µL de lysat (concentrations protéiques aux environs de 2,5µg/µL), complété à 100µL avec le tampon de lyse. Il est alors ajouté 100µL de substrat de la phosphatase alcaline (paranitrophenol phosphate (pNPP) 4 mM / 50mM glycine pH 10,5 / ZnCl 1 mM / MgCl 0,5 mM / $CaCl_2$ 5 mM). Laisser incuber 30 min à 37°C et arrêter avec 50µL de NaOH 10N.

La coloration jaune du paranitrophenol proportionnelle à l'activité de la PA est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 405 nm et rapportée à la quantité de protéines contenue dans l'échantillon, dosée en microBCA (Pierce). Cette activité est comparée à un échantillon standard de PA commerciale purifiée.

b) Activité dipétidyle peptidase-IV (DPPIV)

Les cellules Caco-2 sont différenciées pendant 7, 15 et 21 jours. Après un traitement à l'Ucn3 (100nM), les cellules sont lysées dans un tampon Na_2SO_4 5 mM / TRIS-HCl pH 7.4 1 mM. Les cellules sont ensuite raclées et les membranes cellulaires sont cassées par sonication, 30 secondes à 400 joules/watt.sec en chambre froide.
On dépose sur une plaque 96 puits 50µL de lysat cellulaire et 50µL de substrat de la DPPIV (3mM Glypro-p-nitroanilide dans du tampon Tris 50mM pH7.4). Incuber 30 min à 37°C, puis stopper la réaction avec 50µL de tampon acétate de sodium 0,1M pH4.2. L'absorbance est lue à 420 nm et rapportée à la quantité de protéines contenue dans l'échantillon, dosée en microBCA (Pierce).

9) Analyses densitométriques et statistiques

Les graphiques représentent la valeur moyenne ± l'écart à la moyenne (SEM), des activités spécifiques ou des niveaux d'expression protéique mesurés par analyse densitométrique dans le logiciel « Image J » (NIH).
Les tests statistiques utilisés sont des tests de Student pour les données appariées (mesures d'expressions protéiques effectuées dans les lignées cellulaires). Les niveaux de significativité sont représentés par des astérisques (*$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$).
Les mesures de fluorescence sont également effectuées dans le logiciel image J pour les profils de fluorescence sur coupe et dans les cellules HT-29 différenciées.

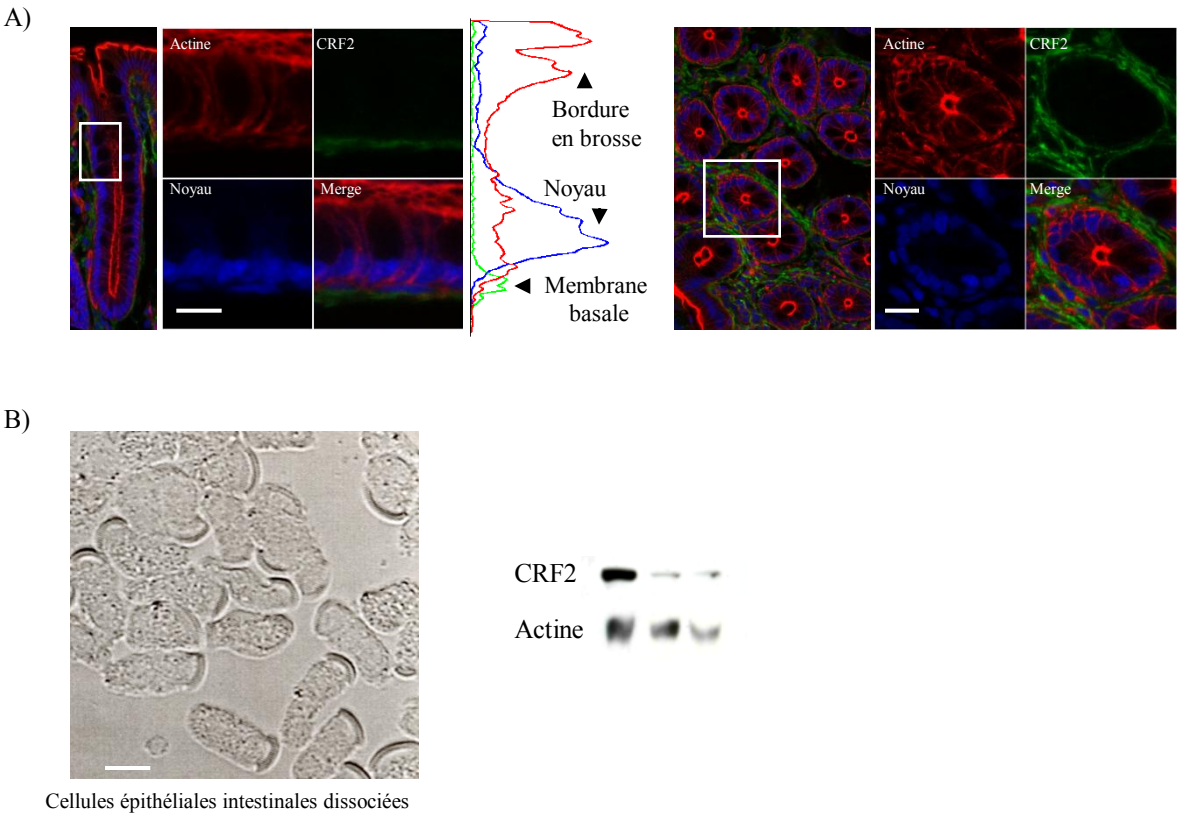


Figure 47 : Expression et localisation du CRF2 dans les cellules épithéliales de rat .

A) Analyse de la localisation du CRF2 réalisée sur une coupe de côlon proximal de rat.
Le CRF2, l'actine et les noyaux cellulaires ont respectivement été identifiés avec Alexa 488 (vert), de la phaloïdine-TRITC (rouge) et du To-pro 3 (bleu).
A gauche : coupes longitudinales; à droite: coupes transversales représentatives de cryptes de l'épithélium. Les profils de fluorescences sont mesurés selon l'axe baso-apical d'une cellule épithéliale (milieu).
Le CRF2 est localisé au pôle basal des cellules des cryptes et peut également être exprimé par des cellules de la *lamina propria*.
La barre d'échelle est de 5 µm. Acquisitions d'images réalisées sur un microscope confocal Leica TCS SPE à l'objectif x100 à huile.
B) Analyse de l'expression du CRF2 dans les cellules épithéliales de côlon de rat.
L'expression du CRF2 est analysée dans des cellules épithéliales isolées (photo à gauche, microscopie à contraste) des côlons proximaux de rat. Le CRF2 est donc exprimé dans les cellules épithéliales intestinales en absence de stress.
L'actine est utilisé comme dépôt de charge.
3 expériences indépendantes.

Résultats

Expression et localisation du CF2 *in vivo.*

Le CRF2 est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales notamment dans la partie proximale du tube digestif, mais sa distribution membranaire exacte est controversée (pôle apical versus pôle basal). Nous avons voulu vérifier la localisation du CRF2 au niveau des côlonocytes par microscopie confocale sur des coupes de côlons réalisées chez des rats Srague-Dawley.

L'observation des coupes longitudinales (images de gauche) et transversales (images de droite) des cryptes de la Figure 47A montrent que le CRF2 (marquage vert) est exprimé au niveau du pôle basal des cellules épithéliales des cryptes. Le pôle basal étant identifié par la présence du noyau (en bleu) au pôle basal des entérocyte. Le CRF2 est également présent dans certaines cellules de la *lamina propria*.

Les cellules épithéliales du côlon proximal des rats Sprague-Dawley (photo au microscope à contraste de phase) ont isolées et l'expression protéique du CRF2 a été analysée par Western blot (Figure 47B). En absence de stress, le CRF2 est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales de rat.

Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de CRF2 dans différentes lignées cellulaires humaines : SW620, HCT-8, HT-29, Caco-2/TC7. Elles expriment toutes un taux semblable de CRF2 (Ducarouge et al., 2013). Ces cellules diffèrent par leur capacité à mettre en place des jonctions intercellulaires (tableau 16). Seules les cellules HT-29 et Caco-2 ont l'habilité à former des jonctions adhérentes matures, nous avons donc privilégié ces deux lignées cellulaires pour analyser l'effet de l'Ucn3 sur la différenciation entérocytaire.

La régulation du CRF2 lors de la différenciation entérocytaire in vitro

Avant de tester l'effet de la signalisation du CRF2 sur la différenciation entérocytaire, nous avons étudié l'expression de la protéine au cours de la différenciation des cellules HT-29. Ces cellules ont la capacité de se différencier en vers le phénotype « côlonocytes » en substituant le glucose du milieu de culture par du galactose (DMEN Gal). Cette différenciation est significative après 10 jours de culture et se caractérise par l'acquisition de propriétés structurales (polarité, mise en place et maturation des complexes d'adhérence

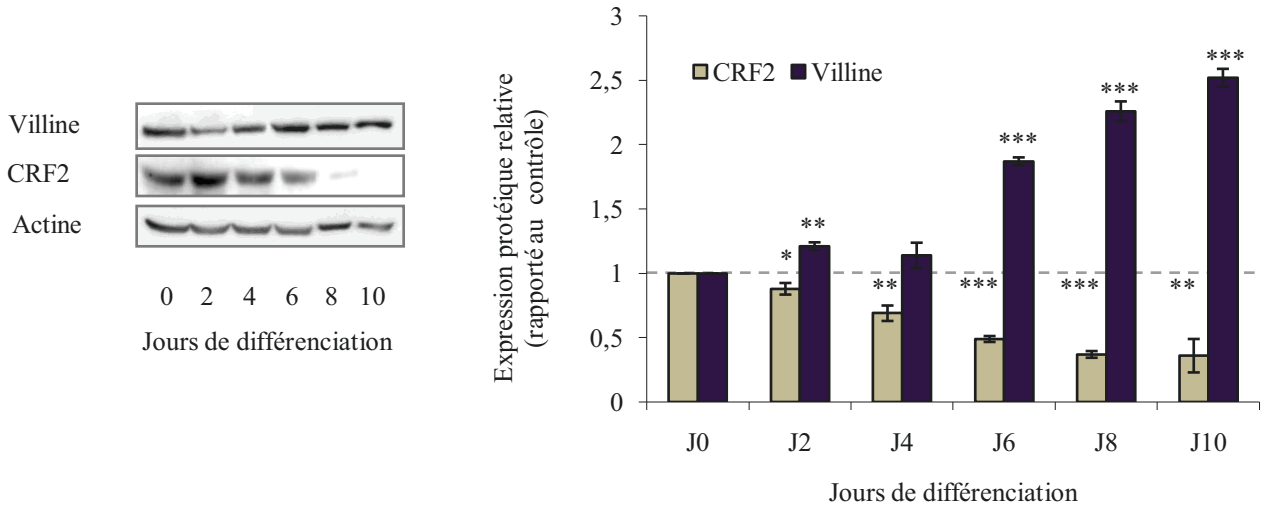


Figure 48 : Expression protéique du CRF2 lors de la différenciation entérocytaire.

Les cellules HT-29 sont différenciées pendant 10 jours dans un milieu DMEN où le glucose est substitué au galactose. La villine est un marqueur précoce de la différenciation entérocytaire: son expression relative augmente donc lors de la différenciation des cellules HT-29. L'expression protéique du CRF2 est inversement proportionnelle au statut de différenciation.

L'actine est utilisé comme dépôt de charge. L'histogramme représente le niveau d'expression du CRF2 ramené à l'actine dans les cellules HT-29.
3 expériences indépendantes réalisées. *p< 0,05 (vs J0); ** p< 0,01 (vs J0), *** p< 0,001 (vs J0).

intercellulaires, développement de microvillosités…) et d'enzyme digestives (comme la PA et DPPIV).

Pour suivre la différenciation entérocytaire, nous avons analysé l'expression protéique de la villine qui est une protéine participant à la structure des microfilaments d'actine dans les microvillosités de bordure en brosse. Nous avons observé une augmentation de l'expression protéique de la villine dès 2 jours de différenciation (+ 21 % /J0) qui atteint son maximum à 10 jours de différenciation (soit + 152 % /J0) (Figure 48). Contrairement à la villine, l'expression du CRF2 diminue au cours de la différenciation des cellules HT-29 (jusqu'à -64 % /J0 à 10 jours de différenciation).

Ce résultat nous permet de penser que l'expression et l'activation de CRF2 pourrait réguler négativement la différenciation entérocytaire. Nous avons donc testé cette hypothèse en utilisant les lignées cellulaire HT-29 et Caco-2.

Le CRF2 altère la perméabilité épithéliale intestinale

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests fonctionnels pour vérifier l'influence de la signalisation CRF2 sur l'efficacité de la perméabilité intestinale (Figure 49). Nous avons tout d'abord analysé l'influence de l'activation du CRF2 sur le transport para- et trans-cellulaire.

Pour apprécier la perméabilité para-cellulaire, nous avons effectué des mesures de résistance électrique trans-épithéliale (TEER) sur des cellules HT-29 différenciées pendant 10 jours (J10). L'effet de l'Ucn3, ligand du CRF2, sur la perméabilité intestinale a été mesuré sur des cellules HT-29 J10 traitées pendant 4 heures avec 100 nM d'Ucn3 (Figure 49A). Le traitement avec l'Ucn3 induit une perte importante et transitoire de la perméabilité illustrée par une diminution de la TEER, avec un maximum à 150 minutes (- 42 % à 150 minutes). Une restauration partielle de la TEER est observée après à 4h de traitement (245 minutes, représentant 90% de la TEER des J10 non traitées). Ces variations de la TEER traduisent une dynamique des jonctions intercellulaires qui semblent initialement altérées par le traitement à l'Ucn3 et qui se reforment avec le temps. L'effet de l'Ucn3 sur la perméabilité intestinale dépend bien de l'activation de CRF2, puisqu'en présence d'Astressin 2B (A2b), un antagoniste du CRF2 nous n'observons plus de diminution de la TEER sous l'effet de l'Ucn3, celle-ci reste stable à environ 150 Ù.cm².

Ensuite nous avons étudié l'effet de l'Ucn3 sur le transport transcellulaire et mesurant la vitesse d'échange d'un traceur, le dextran-FITC (4 KDa) d'un pôle à l'autre des cellules HT-

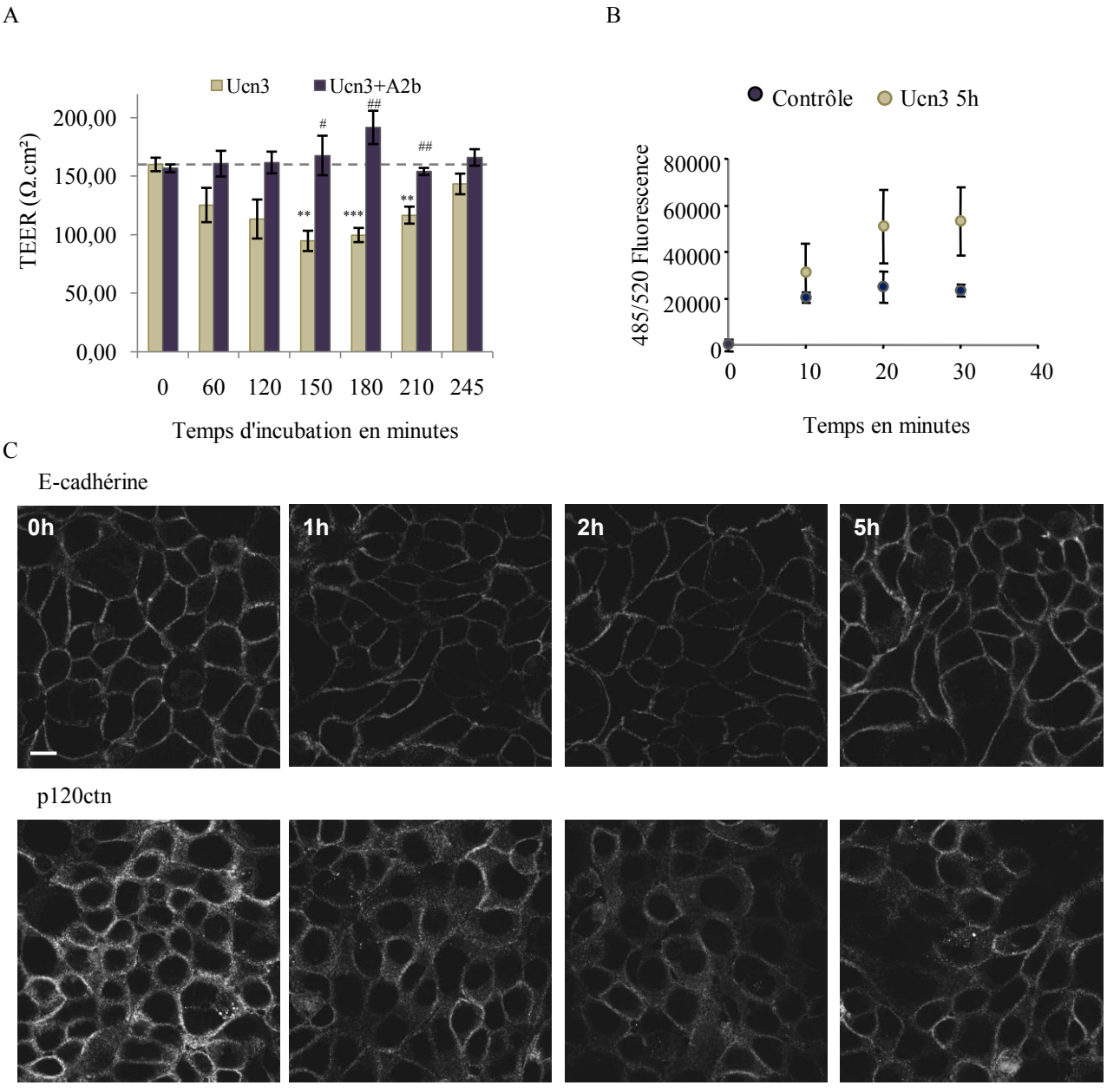


Figure 49 : Le CRF2 augmente la perméabilité épithéliale para-cellulaire et trans-cellulaire.

A) Le CRF2 augmente la perméabilité paracellulaire. La résistance transépithéliale (TEER) reflète la perméabilité paracellulaire et l'intégrité des jonctions intercellulaires. Les cellules HT-29 sont différenciées sur insert pendant 10 jours (J10) dans un milieu DMEN Gal. Les histogrammes représentant les mesures de la TEER (Ω.cm²) des cellules HT-29 J10 traitées à Ucn3 (100nM, 0-245 minutes) avec ou sans prétraitement à l'astressin 2B (1µM, ON, A2b) antagoniste du CRF2. La TEER est suivie à l'aide d'un volt-ohmmètre Milicell. La diminution de la TEER corrèle avec une augmentation de la perméabilité paracellulaire. En absence de traitement la TEER est stable (environ 160 Ω.cm² pendant 245 minutes) (non montré). L'Ucn3 induit une diminution de la TEER qui est abrogée par l'A2b. Expériences réalisées 3 fois.** p< 0,01 (vs Ucn3 0 min), *** p< 0,001 (vs Ucn3 0 min), ## p< 0,01 (vs Ucn3 à l'instant t), ### p< 0,001 (vs Ucn3 à l'instant t).

B) Le CRF2 augmente la perméabilité transcellulaire. La mesure du passage du dextran-FITC (4 kDa) permet de mettre en évidence le flux transcellulaire. Les cellules HT-29 sont différenciées sur inserts comme pour la TEER. Après traitement (Ucn3, 100nM, 5 heures) ou dans des conditions contrôles, le dextran-FITC est ajouté dans le compartiment apical. A 10, 20, 30 et 40 minutes, la quantité de fluorescence est mesurée dans le compartiment basal avec un fluorimètre lecteur de microplaque aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission suivantes : 485-520 nm. L'augmentation de la fluorescence dans le compartiment basal reflète une augmentation du flux transcellulaire. L'Ucn3 semble augmenter le transport transcellulaire. Expériences réalisées trois fois.

C) Le CRF2 conduit à la délocalisation des protéines des jonctions adhérentes. Les cellules HT-29 CRF2-GFP sont différenciées en milieu DMEN Gal puis traitées à l'Ucn3 (100 nM, 0-5h). Les immunofluorescences de la E-cadhérine (en haut) et de la p120ctn (en bas), deux protéines des jonctions adhérentes en microscopie confocale mettent en évidence leur délocalisation après un traitement à l'Ucn3. Barre d'échelle 5µm. Les acquisitions d'images sont réalisées sur un microscope confocal Leica TCS SPE à l'objectif x100 à huile.

29 différenciées (figure 49B). Les cellules HT-29 J10 sont traitées pendant 5 heures à l'Ucn3 (100 nM) puis le dextran-FITC est ajouté dans le compartiment apical. Après 10, 20, 30 et 40 minutes, la quantité de fluorescence est mesurée dans le compartiment basal avec un fluorimètre. Dans des conditions contrôles, la vitesse du transport trancellulaire est stable (environ 2000 unité arbitraire) alors que l'Ucn3 augmente la vitesse du transport trancellulaire du FITC-dextran à 3000 UA au bout de 10 min et 5000 UA à partir de 20 min. L'activation du CRF2 influence donc la perméabilité intestinale en augmentant les transports trans- et para- cellulaires.

L'augmentation du transport para-cellulaire peut être illustrée par une altération des jonctions intercellulaires. Nous avons donc vérifié s'il n'y avait pas de modification dans la distribution cellulaire des protéines des jonctions adhérentes comme la E-cadhérine et la p120ctn. En effet, les cellules HT-29 différenciées expriment peu de protéines des jonctions serrées qui ne sont pas très « matures » dans ce modèle. La localisation de la E-cadhérine et de la p120ctn a été suivie en microscopie confocale dans des cellules HT-29 J10 traitées avec 100 nM d'Ucn3 selon les temps indiqués (Figure 49C). En absence de traitement avec l'Ucn3, la E-cadhérine est localisée à la membrane plasmique au niveau des contacts intercellulaires. Cette distribution membranaire est altérée après une et deux heures de traitement à l'Ucn3 puis restaurée à 5 heures. La p120ctn est décrite comme un régulateur de la fonction de la E-cadhérine et de sa stabilité à la membrane plasmique. L'association E-cadhérine/p120ctn est régulée par des processus de phosphorylation-déphosphorylation, et la perte de cette association conduit à l'endocytose de la E-cadhérine qui est soit recyclée soit dégradée (Anastasiadis & Reynolds, 2000). Dans des conditions contrôles, la p120ctn est exprimée au niveau des zones de contacts cellulaires et un peu dans le cytoplasme. Après une ou deux heures de traitement avec l'Ucn3, l'expression de la p120ctn est diminuée dans ce plan de la cellule, particulièrement au niveau des zones de contact. Après 5 heures de traitement, la localisation de la p120ctn est retrouvée dans certains contacts intercellulaires.

La mise en place des jonctions adhérentes fonctionnelles nécessitet une étape de « maturation » caractérisée par un regroupement des protéines des jonctions intercellulaires dans les radeaux lipidiques (RL). Nous avons donc examiné l'effet de l'Ucn3 sur la distribution des protéines des JA dans les RL. Les RL sont identifiés par la flotiline, un marqueur spécifique. L'expression de la flotiline, de la E-cadhérine et de la p120ctn a été

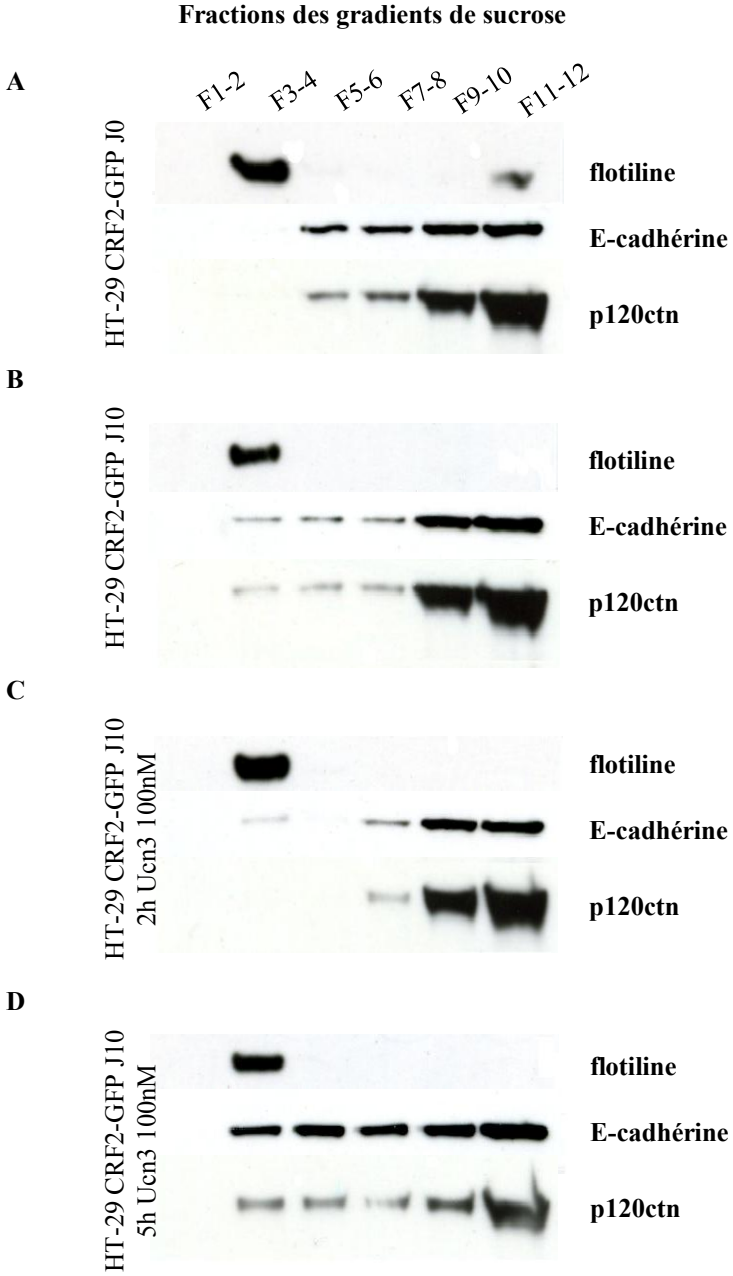


Figure 50 : Le CRF2 altère la localisation des jonctions adhérentes dans les cellules HT-29 CRF2-GFP.

La flotiline est un marqueur des radeaux lipidiques (RL) (fraction 3-4). La E-cadhérine et p120ctn sont des protéines des jonctions adhérentes. La formation de jonctions adhérentes matures à la membrane est indiquée par la colocalisation de la flotiline et de la E-cadhérine et de p120ctn.
En absence de différenciation (HT-29 J0): Il n'y a pas de jonction adhérente matures (A),.
Lorsque les cellules sont différenciées (HT-29 J10): Ces jonctions adhérentes matures s'établissent après 10 jours de différenciation (B).
L'Ucn3 (100 nM) altère la localisation des protéines des jonctions adhérentes dans les RL après deux heures d'incubation (C). Après 5 heures de traitement à l'Ucn3 (100 nM), les protéines des jonctions adhérentes sont à nouveau dans les radeaux lipidiques (D).
Les membranes des cellules HT-29 ont été séparées sur gradients de saccharose et prélevées en 12 fractions de haut en bas du gradient. Un volume équivalent des fractions F1-2 à F11-12 a été déposé sur gel SDS-PAGE et analysé par westernblot pour la flotiline, la E-cadhérine et la p120ctn.

analysée par Western blot dans les différents compartiments membranaires obtenus après leur séparation sur gradients de saccharose, à partir des cellules HT-29 non différenciées (J0) et différenciées 10 jours (J10) puis traitées à l'Ucn3 (100 nM, 2 ou 5 heures) (Figure 50). Dans les cellules HT-29 J0 ou J10, les RL sont identifiés dans les fractions 3-4 (F3-4) par la présence de la flotiline. Elle est également très légèrement exprimée dans la fraction F11-12 des cellules à J0.

Dans les cellules HT-29 non différenciées (J0), la E-cadhérine et la p120ctn sont absentes des RL et exprimées au niveau des fractions 5 à 12 avec un niveau plus élevé dans les fractions 9 à 12 (Figure 50A). Ces résultats corroborent le fait que les JA ne sont pas matures dans les cellules non différenciées.

Dans les cellules HT-29 différenciées (J10), une fraction de E-cadherine et de p120ctn sont exprimées dans les RL (F3-4) mais également dans les fractions 5-6 et 7-8 et semblent plus fortement exprimées dans les fractions 9 à 12 (Figure 50B). Ces observations appuient le fait que des JA matures commencent à se mettre en place après 10 jours de différenciation.

Après deux heures de traitement à l'Ucn3, l'expression de la E-cadhérine semble diminuée dans la fraction F3-4 et la p120ctn est absente des RL (Figure 50C). La E-cadhérine et p120ctn disparaissent également de la fraction F5-6 mais leurs expressions restent inchangées dans les fractions 9 à 12. Ces résultats semblent indiquer que le traitement par l'Ucn3 altère l'organisation des jonctions adhérentes dans les cellules différenciées HT-29.

Après 5 heures de traitement à l'Ucn3, la E-cadhérine et la p120ctn sont ré-exprimées dans les fractions 3 à 8. Cette expression semble être plus élevée que dans les cellules J10 non traitées (Figure 50D). Les niveaux de E-cadhérine exprimés dans les fractions 9 à 12 semblent inchangés alors qu'ils sont diminués pour la p120ctn. La restauration de la E-cadhérine et de p120ctn dans les RL corrèle avec le rétablissement des protéines des JA aux contacts cellulaire (figure 49C) et l'efficacité de la perméabilité intestinale (figure 49A).

L'ensemble de ces résultats indique que l'activation du CRF2 conduit à une désorganisation des JA dans les cellules différenciées HT-29 qui est sans doute responsable de la modification de la perméabilité para- et trans-cellulaire.

L'influence de l'activation du CRF2 sur la perméabilité para-cellulaire, a été confirmé au cours de la différenciation des cellules Caco-2 qui se différencient spontanément vers un phénotype entérocytaire dès la confluence des cellules en culture (Pinto, Rabine-leon, Appay, Kedinger, & Zweibaum, 1983). Ainsi aux stades précoces de culture, les cellules sont

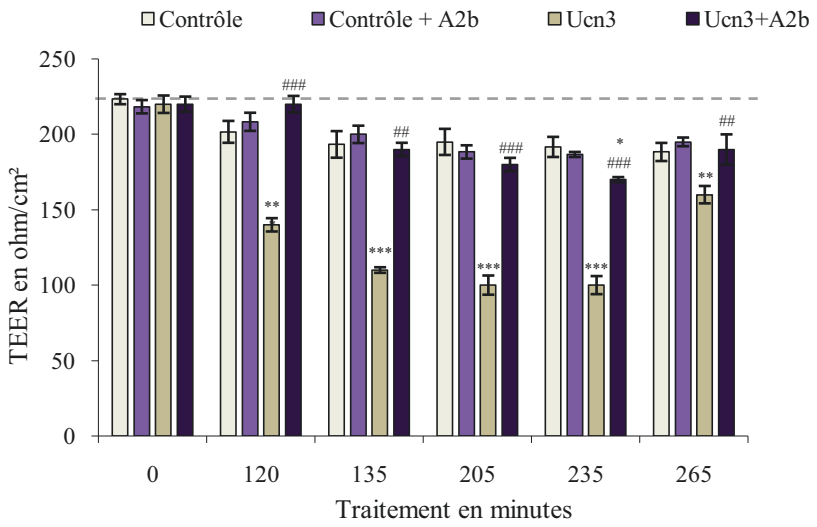


Figure 51 : Influence de l'activation du CRF2 sur la perméabilité intestinale.

Les cellules Caco-2 sont différenciées sur insert dans un milieu DMEN. Les cellules différenciées 21 jours sont alors traitées à l'Ucn 3 (100 nM). Elles peuvent également être prétraitées à l'astressin 2B (1µM, ON), antagoniste spécifique de CRF2. La TEER est suivie pendant 265 minutes à l'aide d'un volt-ohmmètre Milicell.
La diminution de la TEER corrèle avec une augmentation de la perméabilité trans-cellulaire. En absence de traitement la TEER est stable, l'astressin 2B (A2b) seul n'influence pas la TEER. L'Ucn3 induit une diminution de la TEER qui est abrogé par l'A2b.
Expériences réalisées 3 fois, en duplicata.
** p< 0,01 (vs contrôle), *** p< 0,001 (vs contrôle), ## p< 0,01 (vs Ucn3), ### p< 0,001 (vs Ucn3).

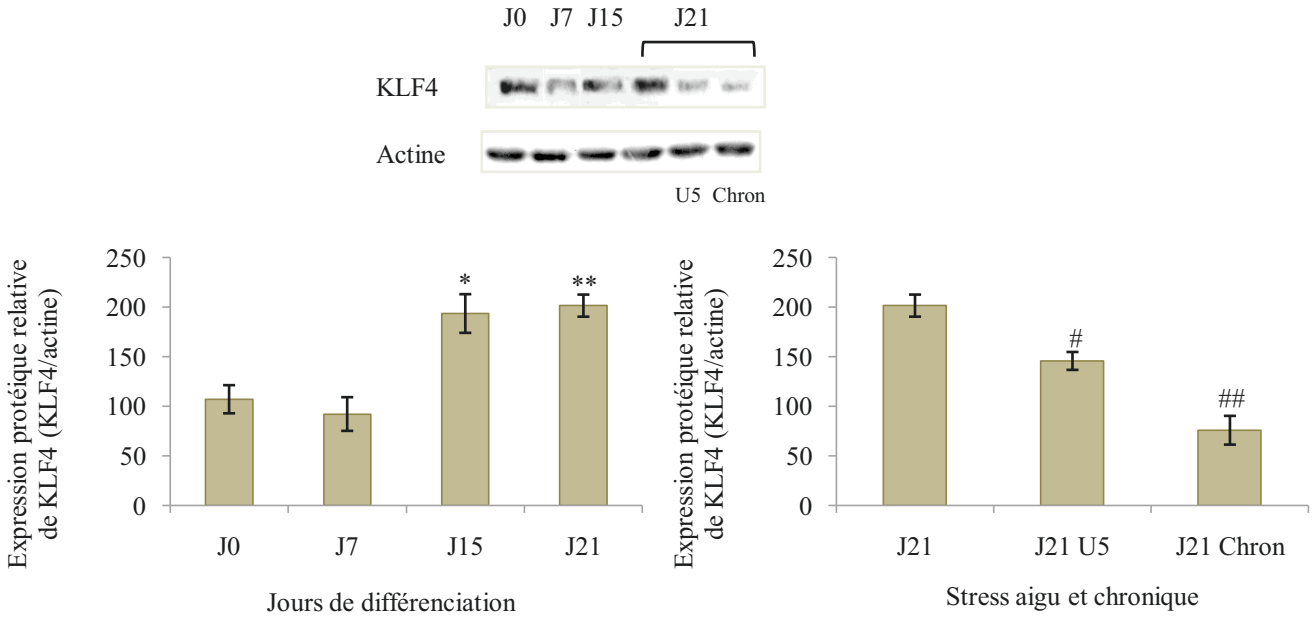


Figure 52 : Expression protéique de KLF4 pendant la différenciation des cellules Caco-2 et influence de l'Ucn3.

KLF4 est un facteur de transcription qui régule de nombreux gènes impliqués dans la différenciation entérocytaire : KLF4 active la transcription de la phosphatase alcaline.
Les cellules Caco-2 sont différenciées dans un milieu de culture DMEN. L'expression protéique relative de KLF4 augmente lors de la différenciation et atteint son maximum dès 15 jours. * p< 0,05 (vs J0); ** p< 0,001 (vs J0).
Le stress aigu (U5) induit la diminution de l'expression de KLF4 (-28%) dans des cellules Caco-2 différenciées 21 jours (J21). Le stress chronique (Chron) induit également une diminution de l'expression de KLF4 (-63%) dans des cellules Caco-2 différenciées pendant 21 jours.
# p< 0,05 (vs J21); ## p< 0,001 (vs J21).
Expériences réalisées 3 fois.

indifférenciées alors que 20 à 40 jours après la confluence, elles forment une monocouche de cellules polarisées avec des microvillosités apicales et établissent des contacts intercellulaires comme des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (Beaulieu & Quaroni, 1991; Hauri, Roth, Sterchi, & Lentze, 1985; Vachon & Beaulieu, 1992).

L'absence de traitement ou la présence d'A2b n'altèrent pas la perméabilité paracellulaire des cellules Caco-2 différenciées pendant 21 jours, comme l'indique les mesures de TEER (figure 51). Le traitement à l'Ucn3 conduit à une diminution de la TEER dès 120 minutes (-35% comparé au contrôle) et jusqu'à 235 minutes (-50% comparé au contrôle). On note cependant à retour de la TEER vers les valeurs initiales à 265 minutes (-25% comparé au contrôle). En présence d'A2b, l'Ucn3 n'induit pas de diminution significative de la perméabilité épithéliale. L'activation du CRF2 dans les caco-2 induit une altération des jonctions intercellulaires illustrée par une augmentation du transport paracellulaire.

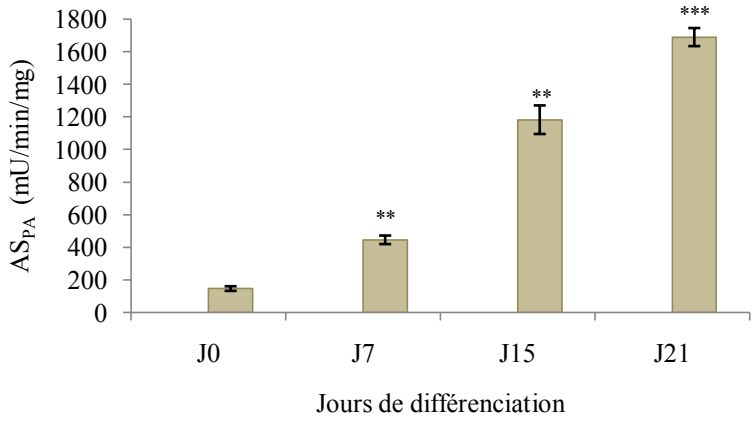
Le CRF2 retarde la différenciation des cellules Caco-2

La différenciation des cellules Caco-2 est caractérisée par l'expression au pôle apical des bordures en brosse, d'enzymes digestives présentent dans les villosités de l'intestin grêle comme la PA et la DPPIV (Beaulieu & Quaroni, 1991; Hauri et al., 1985; Vachon & Beaulieu, 1992).

L'expression de ces enzymes est sous le contrôle de facteur de différenciation tel que KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) ; un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la régulation du lignage cellulaire au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales de l'intestin. Dans l'intestin sain, KLF4 est exprimé dans les cellules différenciées (Yu et al., 2012). Dans un premier temps, nous avons étudié la régulation de l'expression protéique de KLF4 au cours de la cinétique de différenciation des cellules Caco-2 ainsi que l'effet d'un traitement aigu ou chronique par l'Ucn3 à 21 jours de différenciation (figure 52).

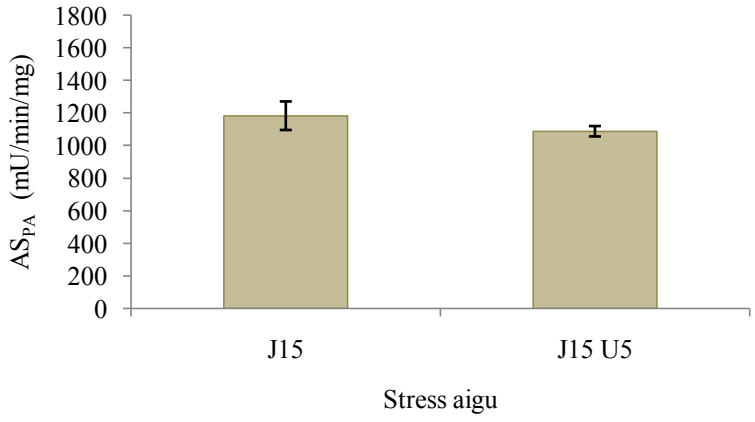
L'expression protéique de KLF4 augmente après 7 jours de différenciation et semble atteindre un niveau plateau entre 15 et 20 jours de différenciation qui correspond à un facteur 2 par rapport à l'expression à J0. D'après la littérature les cellules Caco-2 sont différenciées dès 20 jours de culture, ce qui corrèle avec l'augmentation protéique de KLF4.

Le traitement aigu par l'Ucn3 (100 nM, 5h noté U5) des cellules Caco-2 différenciées (J21) induit une diminution modérée mais significative de l'expression de KLF4 (-28 % comparé à J21) alors qu'un traitement chronique à l'Ucn3 (J21 Chron) diminue de 63 %



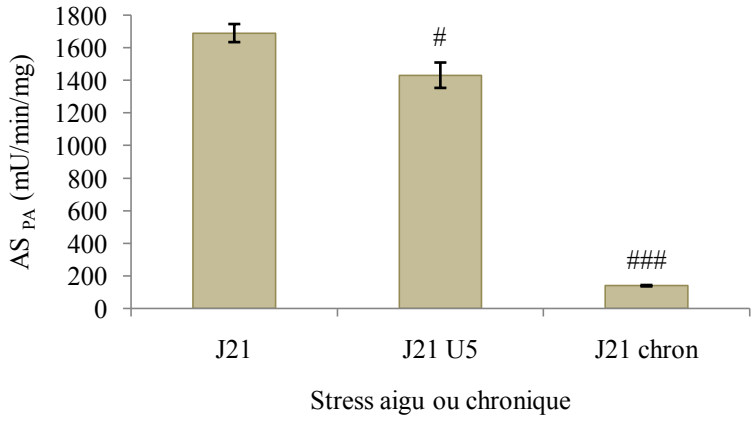
Activité de la PA pendant la différenciation entérocytaire.

L'A.S de la PA est augmentée lors de la différenciation des cellules Caco-2.
** p< 0,01 (vs J0); ***p< 0,001 (vs J0)



Effet d'un stress aigu sur l'A.S de la PA des cellules Caco-2 différenciées.

L'activité spécifique de la PA n'est pas modifiée lors d'un stress aigu (induit par l'Ucn3, 100 nM, 5h) dans des cellules Caco-2 différenciées 15 jours (J15).



Effet d'un stress aigu et chronique sur l'A.S de la PA des cellules Caco-2 différenciées.

L'activité spécifique de la PA est légèrement diminuée lors d'un stress aigu (-16%) (induit par l'Ucn3, 100 nM, 5h) et fortement lors d'un stress chronique (-92%) (induit par l'Ucn3, 100nM) dans des cellules Caco-2 différenciées 21 jours (J21).
# p< 0,05 (vs J21); ### p< 0,001 (vs J21)

Figure 53 : Etude de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline lors de la différenciation des cellules Caco-2.

L'entérocyte mature acquière de nouvelles caractéristiques fonctionnelles dont des enzymes digestives comme la phosphatase alcaline (PA). L'activité de cette enzyme est utilisée comme marqueur de différenciation entérocytaire.
Les cellules Caco-2 sont différenciées pendant 21 jours dans un milieu de culture DMEN. La coloration jaune du paranitrophenol (produit par l'activité enzymatique de la PA) proportionnelle à l'activité spécifique de la PA est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm et rapportée à la quantité de protéines contenue dans l'échantillon.

Le stress aigu peut être induit par l'Ucn3 (100nM) pendant 5 heures . Lors d'un stress chronique l'Ucn3 est renouvelé tous les deux jours pendant la différenciation.

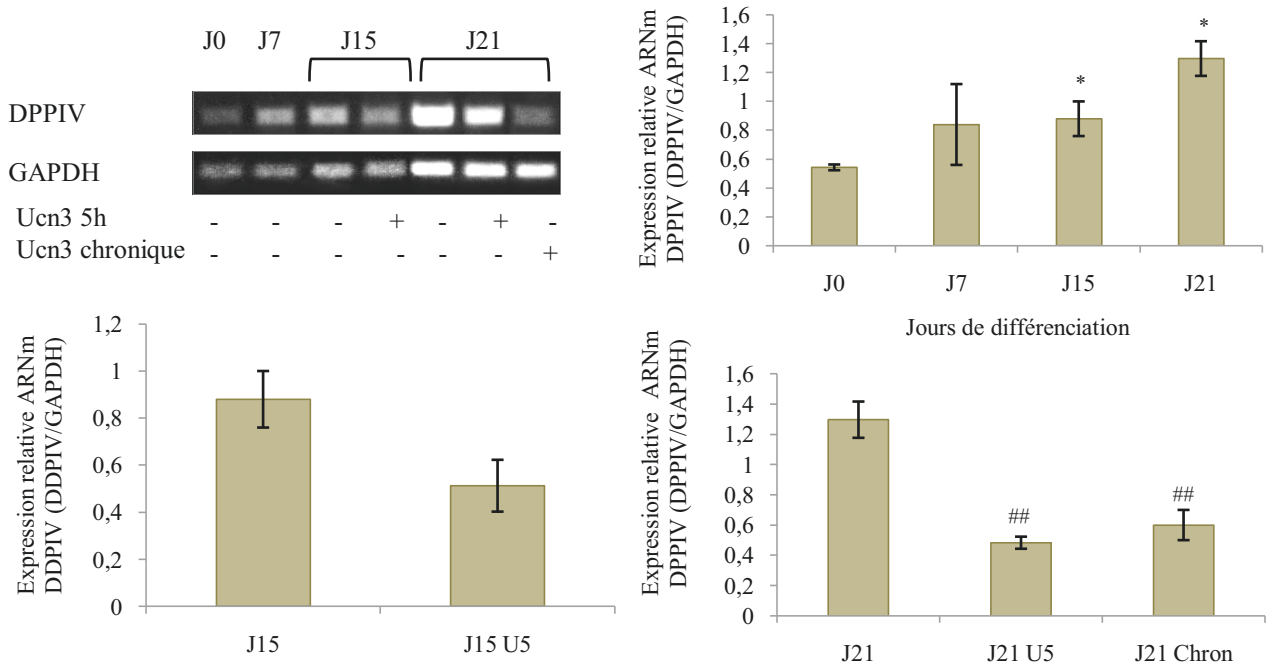


Figure 54 : Influence de l'Ucn3 sur l'expression des transcriptions de DPPIV.

La DPPIV est utilisée comme marqueur de la différenciation entérocytaire. Les cellules Caco-2 sont différenciées dans un milieu de culture DMEN. Les cellules subissent après 15 (J15) ou 21 (J21) jours de différenciation un stress aigu (U5) induit par un traitement à l'Ucn3 (100 nM) de 5 heures. Les cellules peuvent également subir un stress chronique (Chron) tout au long de la différenciation par un traitement à l'Ucn3 (100 nM) tous les deux jours.
Le taux de transcription de l'ARNm de la DPPIV augmente lors de la différenciation entérocytaire. Cependant il est diminué par l'Ucn3. L'extraction des ARN est permise par l'utilisation de kit Nucleopsin (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. Les ARN sont soumis à une reverse transcriptase. Les PCR sont réalisées avec les amorces adéquates selon le nombre de cycles et le Tm indiqués dans le tableau 17.
* p< 0,05 (vs J0), ## p< 0,005 (vs J21).

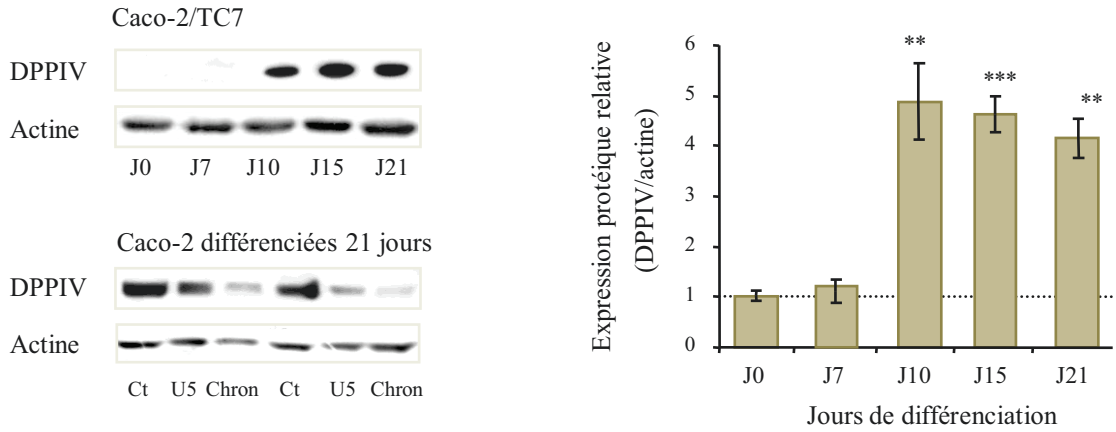
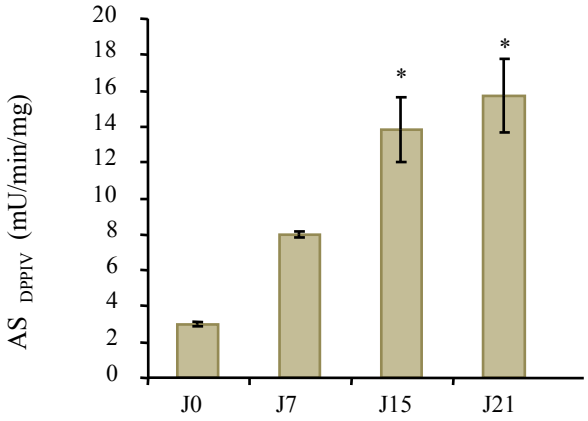


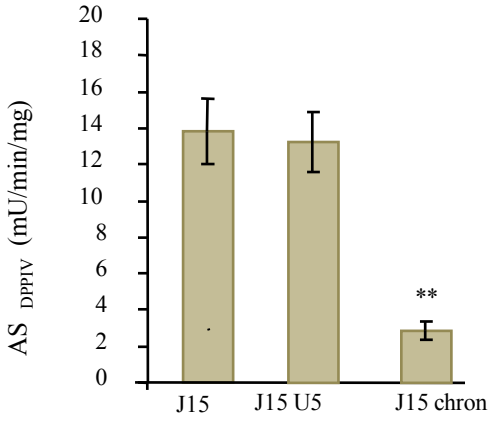
Figure 55 : Effet de l'Ucn3 sur l'expression protéique de DPPIV lors de la différenciation des cellules Caco-2.

L'histogramme de l'expression protéique de DPPIV indique une augmentation de ce marqueur dès 10 jours de différenciation (5 X vs J0).
L'Ucn3 semble diminuer l'expression de la DPPIV lors d'un stress aigue, induit par l'Ucn3 100 nM pendant 5 heures (U5), ou lors d'un stress chronique induit par l'Ucn3 additionné au milieu de culture pendant les 21 jours de différenciation (Chron). L'actine est utilisé comme dépôt de charge. Expériences réalisées trois fois (sans traitement à l'Ucn3) et deux fois (avec traitment à l'Ucn3).
** p< 0,01 (vs J0), *** p< 0,001 (vs J0).



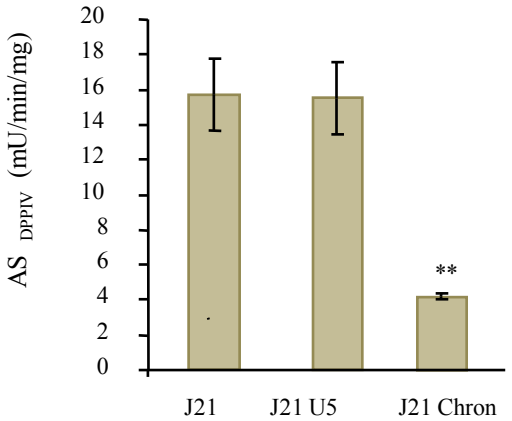
L'A.S de la DPPIV pendant la différenciation des cellules Caco-2.

L'A.S de la DPPIV augmente graduellement lors de la différenciation des cellules Caco-2.
* p< 0,015 (vs J0)



Effet d'un stress aigu et chronique sur l'A.S de la DPPIV des cellules Caco-2 différenciées.

L'AS de la DPPIV n'est pas modifiée lors d'un stress aigu (induit par l'Ucn3, 100 nM, 5h) mais est diminué (-70%) dans un stress chronique dans des cellules Caco-2 différenciées 15 jours (J15).
** p< 0,01 (vs J15).



Effet d'un stress aigu et chronique sur l'A.S de la PA des cellules Caco-2 différenciées.

L'AS de la DPPIV n'est pas influencée lors d'un stress aigu (induit par l'Ucn3, 100 nM, 5h). L'activité de la DPPIV est diminuée lors d'un stress chronique (-65%) (induit par l'Ucn3, 100nM) dans des cellules Caco-2 différenciées 21 jours (J21).
** p< 0,001 (vs J21)

Figure 56 : Etude de l'activité spécifique de la DPPIV au cours la différenciation des cellules Caco-2.

L'activité spécifique (A.S) de DPPIV est utilisée comme marqueur de différenciation.
Les cellules Caco-2 sont différenciées pendant 21 jours dans un milieu de culture DMEN. L'activité spécifique de la DPPIV est mesurée par spectrophotométrie à 420 nm et rapportée à la quantité de protéines contenue dans l'échantillon.
Le stress aigu peut être induit par l'Ucn3 (100nM) pendant 5 heures. Lors d'un stress chronique l'Ucn3 est renouvelé tous les deux jours pendant la différenciation.

l'expression protéique de KLF4 comparé à J21 (figure 52). L'activation du CRF2 pourrait donc entrainer un retard dans la différenciation des entérocytes. L'influence de l'Ucn3 est d'autant plus importante quand cette molécule est utilisée en chronique.

La protéine KLF4 contrôle la régulation d'expression d'enzyme digestive comme la PA. Cette enzyme digestive est exprimée uniquement dans les cellules différenciés et sert de marqueur de différenciation entérocytaire (Hinnebusch et al., 2004). Nous avons donc regardé si l'activation de CRF2 altérait la différenciation entérocytaire en mesurant l'activité de la PA dans des lysats cellulaires prélevés au cours de la différenciation des cellules Caco-2 (Figure 53). Les cellules sont traitées ou non avec 100 nM d'Ucn3 pour mimer un stress aigu ou chronique. Lors d'un stress chronique, l'Ucn3 est renouvelée tous les deux jours de la différenciation de J0 jusqu'à J21.

L'activité spécifique (A.S.) de la PA augmente graduellement au cours de la différenciation des cellules Caco-2 (X3 à J7/J0 ; X8 à J15/J0 et X21 à J21/J0). Le traitement aigu par l'Ucn3 (U5) n'affecte pas l'A.S. de la PA à J15 mais l'inhibe significativement à J21 (-16 % comparé à J21). L'effet de l'Ucn3 est plus important en chronique (J21 chron) où l'activation du CFR2 induit une perte d'A.S. de la PA qui atteint 92% (comparé au J21).

Pour confirmer nos résultats sur le retard de différenciation entérocytaire engendré par l'activation de CRF2, nous nous sommes intéressées à la régulation de l'expression d'une autre enzyme digestive spécifique des entérocytes, la DPPIV.

Dans un premier temps, nous avons quantifié le taux de transcription d'ARNm de DPPIV lors de la différenciation des cellules Caco-2 (figure 54). Celui-ci augmente de façon graduelle au cours de la différenciation des cellules Caco-2 (+ 54 % àJ7/J0 ; + 62 % à J15/J0 et + 138 % à J21/J0). Un stress aigu (Ucn3 100 nM, 5h noté U5) n'a pas d'influence sur le taux d'ARNm de DPPIV à J15. A contrario sur des cellules Caco-2 différenciées pendant J21 jours, les stress par l'Ucn3 aigu ou chronique provoquent une diminution de l'ARNm de DPPIV (environ -60 % comparé à J21).

Dans un second temps, nous avons analysé l'expression protéique de DPPIV dans les mêmes conditions (figure 55). L'expression protéique de DPPIV augmente dès 10 jours et jusqu'à 21 jours (environ X4-5 comparé à J0). Cette hausse plus tardive que pour le taux d'ARNm pourrait être expliquée par le temps nécessaire à la traduction des ARNm et la maturation des protéines. Le stress aigu ainsi que le stress chronique semble diminuée

l'expression protéique de DPPIV à J21 ce qui corrèle avec la diminution de l'ARNm observée (J21 U5 et J21 chron).

Enfin nous avons corrélé ces variations d'expression de DPPIV à des mesures d' A.S. (figure 56). Lors de la différenciation des cellules Caco-2, l'activité enzymatique de la DPPIV augmente dès 7 jours et significativement dès 15 jours (+ 70 % comparé à J0). Alors que le stress aigu conduit à une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine, il n'influence pas l'activité enzymatique de DPPIV. En revanche, le stress chronique provoque une diminution (environ 70 %) de l'A.S. de la DPPIV à J15 et J21.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

CRF2 Signaling Is a Novel Regulator of Cellular Adhesion and Migration in Colorectal Cancer Cells

Benjamin Ducarouge[1,2], Marjolaine Pelissier-Rota[1,2], Michèle Lainé[1,2], Nadine Cristina[1,2], Yvan Vachez[2], Jean-Yves Scoazec[3], Bruno Bonaz[1,2,4], Muriel Jacquier-Sarlin[1,2]*

1 Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, INSERM U836, Grenoble, France, **2** Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France, **3** Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France, **4** Centre Hospitalo Universitaire de Grenoble, Grenoble, France

Abstract

Stress has been proposed to be a tumor promoting factor through the secretion of specific neuromediators, such as Urocortin2 and 3 (Ucn2/3), however its role in colorectal cancer (CRC) remains elusive. We observed that Ucn2/3 and their receptor the Corticotropin Releasing Factor receptor 2 (CRF2) were up-regulated in high grade and poorly differentiated CRC. This suggests a role for CRF2 in the loss of cellular organization and tumor progression. Using HT-29 and SW620 cells, two CRC cell lines differing in their abilities to perform cell-cell contacts, we found that CRF2 signals through Src/ERK pathway to induce the alteration of cell-cell junctions and the shuttle of p120ctn and Kaiso in the nucleus. In HT-29 cells, this signaling pathway also leads to the remodeling of cell adhesion by i) the phosphorylation of Focal Adhesion Kinase and ii) a modification of actin cytoskeleton and focal adhesion complexes. These events stimulate cell migration and invasion. In conclusion, our findings indicate that CRF2 signaling controls cellular organization and may promote metastatic potential of human CRC cells through an epithelial-mesenchymal transition like process. This contributes to the comprehension of the tumor-promoting effects of stress molecules and designates Ucn2/3-CRF2 tandem as a target to prevent CRC progression and aggressiveness.

Citation: Ducarouge B, Pelissier-Rota M, Lainé M, Cristina N, Vachez Y, et al. (2013) CRF2 Signaling Is a Novel Regulator of Cellular Adhesion and Migration in Colorectal Cancer Cells. PLoS ONE 8(11): e79335. doi:10.1371/journal.pone.0079335

Editor: Alice Y. W. Chang, Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan

Received July 1, 2013; **Accepted** September 30, 2013; **Published** November 18, 2013

Copyright: © 2013 Ducarouge et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (www.arc-cancer.net), Ligue Nationale contre le Cancer (www.ligue-cancer.net), Association François Aupetit (www.afa.asso.fr), GEFLUC (www.gefluc.org) and ESPOIR Isère Cancer (www.espoir-isere-cancer.com). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

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

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death in Western countries. Histological grade is an important prognostic marker as high-grade, poorly differentiated tumors are usually more aggressive and invasive than their low-grade, well-differentiated counterparts. A hallmark of CRC is loss of cellular organization. Adhesive interactions between cells and extracellular matrix (ECM) are key determinants of tissue organization and their modulations participate in cell migration and tumor metastasis.

In epithelial cells, cell-cell adhesion is maintained through several protein complexes such as adherens junctions (AJ). Cadherins are transmembrane proteins that nucleate AJ by forming homotypic calcium dependent interactions with cadherins from neighboring cells. Manipulation of E-cadherin function in the intestinal epithelium has revealed an important role in cell differentiation or cell/matrix adhesion [1]. E-cadherin is diminished in invasive CRC together with the acquisition of a mesenchymal phenotype [2]. The intracellular domain of E-cadherin interacts directly with β- and p120 catenins (ctn). They regulate AJ by controlling cadherin clustering, endocytosis or stability and actin cytoskeleton anchorage (reviewed in [3]). In E-cadherin deficient cells p120ctn shuttles to the cytoplasm and/or the nucleus where it exerts different functions depending on its partners [4,5]. In the nucleus, p120ctn can interact with the transcription factor Kaiso and relieves its gene repression activity [6,7]. Abnormal nuclear localization of p120ctn and Kaiso is prognostic for aggressiveness in CRC [8].

Micro-environment controls cancer progression through cell contacts or mediator signals [9]. The corticotropin releasing factor (CRF) and analogs like urocortins (Ucns) [10] are secreted peptides related to stress. They act through two G protein coupled receptors, CRF1 and CRF2, with different affinities [11]. CRF and Ucn1 bind both receptors, while Ucn2/3 are selective for CRF2. CRF receptors are primarily coupled to Gαs and trigger cAMP formation via adenylyl cyclase activation [12]. If CRF system is well documented in the gastrointestinal tract for its expression and regulation by stress and inflammation, its implication in CRC is poorly investigated [13,14]. Ligands and receptors are expressed and secreted by various normal and cancer cells. Therefore, CRF system could modulate the tumor micro-environment by autocrine/paracrine activations on cancer or stromal cells [9,15,16]. The aim of this study was to determine the expression of CRF2 and its ligands in CRC and how their signaling could participate in the tumor progression. Our results described aberrant expression of CRF2 and ligands in both CRC tumors and cell lines, according to their grade and/or differentiation status. Using the HT-29 and SW620 cell lines, we discovered that CRF2 signaling modifies cellular adhesion and

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers used for qPCR and RT-PCR.

	qPCR	Forward	Reverse	UPL
PGK	X	ctgtggcttctggcatacct	cgagtgacagcctcagcata	**42**
HPRT	X	tgaccttgatttattttgcatacc	cgagcaagacgttcagtcct	**73**
Ucn2	X	tgccccacagagtcacagt	tgtggcagtgacccaactta	**64**
Ucn3	X	ggagggaagtccactctcg	gggcttggctttgtagaactt	**4**
CRF2α	X	tcctgcgaaatgtcatgtg	tgaagatggtggtgatgcag	**18**
Cdh1	X	tggaggaattcttgctttgc	cgctctcctccgaagaaac	**84**
Krt20	X	tgtcctgcaaattgataatgct	agacgtattcctctctcagtctcata	**66**
Vim	X	tggtctaacggtttccccta	gacctcggagcgagagtg	**56**
MMP3		tgtagaaggcacaatatgg	cagtcacttgtctgttgcaca	-
MMP7		atggggaactgctgacatc	ccagcgttcatcctcatcga	-
GAPDH		tcctcctgcacagtca	caccaccttcttgatgtcatc	-

GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; MMP, matrixmetalloproteinase; PGK, phosphoglycerate kinase; HPRT, human phosphoribosyltransferase.

doi:10.1371/journal.pone.0079335.t001

established a mechanism by which stress molecules may participate in tumor progression.

Materials and Methods

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and SW620 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) were cultured at 37°C in a 5% CO2 atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, 5% penicillin and streptomycin. The human CRF2-GFP construct was cloned into the pBabe expression vector. Retroviral infections of HT-29 cells were done as described previously [17] and then cultured in medium containing 2 μg/ml puromycin (BD Biosciences), following to FACS selection of virus-infected cells.

Antibodies and reagent

Polyclonal antibodies directed against CRF2 were from Abcam (12964, Paris, France). The immunizing peptide used to generate the CRF2 antibody was designed in the conserved sequence of the α, β and γ isoforms. This antibody would then recognize all isoforms of the receptor. Anti-human E-cadherin (HECD1) monoclonal antibody was obtained from Takara Biochemicals (Cambrex Bio Science, Paris, France). Monoclonal antibody against p120ctn (clone 98) was purchased from BD Transduction Laboratories (Pont de Claix, France). Anti-actin, anti-MMP3 polyclonal antibodies, and anti-Kaiso, anti-vinculin monoclonal antibodies were obtained from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Polyclonal antibodies directed against Src-P^{Tyr418} were purchased from MBL Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France), monoclonal anti-Src and anti-MMP7 antibodies were from Millipore (Molsheim, France). Monoclonal antibodies against ERK and ERK-P^{Tyr204} were from BD transduction laboratories and Santa cruz from TEBU (Le perray en Yvelines, France) respectively. Polyclonal anti-FAK-P^{Ser910} antobodies were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Alexa–conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Horse Radish Peroxydase–conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France). Topro3 was purchased from Invitrogen. Urocortins, CRF and Astressin 2b were purchased from Sigma Aldrich.

Patient cohort, Tissue Micro Arrays and immunohistochemistry

This study was conducted on cDNA of a cohort of 30 CRC patients. Samples from frozen tumor and peritumoral tissues were obtained from the Tumor Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon, supported by National Institute of Cancer (INCa) and French Ministery of Health. The tissue bank conforms to French regulations. All patients have given written informed consent to the use of tissue samples for research purposes; in the absence of informed consent, tissue samples from patients known to be deceased could also be used for research purposes, in accordance with French regulations. Procedures for collection, storage and release of tissue samples are in accordance with national and international recommendations and a quality management programme has been developed. All projects submitted to the tissue bank are reviewed and approved by its Scientific Committee, which also verifies their conformity to ethical regulations. To preserve anonymity, a specific ID was attributed to each patient. For each sample, the cDNA from tumoral tissue was paired with the cDNA of the adjacent normal tissue. The tumor stages were defined according to the TNM status of the tumors (American Joint Committee on Cancer Staging system). Tissue Micro Arrays (TMA) CDA3 were purchased at SUPER BIO CHIPS (Korea). The slide was blocked in TBS/BSA 3%/Tween-20 0.1% and incubated over night at 4°C with anti-CRF2 at 1:100. The further IHC was performed with Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Courtaboeuf, France), counterstained with 1 min incubation in Hematoxylin, dehydrated and mounted with DPX. Every microscope acquisitions were down in "TRIBUN" and quantified with Image J. The IHC quantifications were performed in ImageJ WCIF with the CIE Lab function of the color based thresholding segmentation to separate the CRF2 staining from the Hematoxylin counter-staining. Six different fields of every sample were segmented and the mean gray value was calculated for the CRF2 and the Hematoxylin. The CRF2 intensity for each sample is the mean of the CRF2/Hematoxylin ratio calculated on the six different fields.

Cell fractionation

For nuclear fractionation, cell were lysed in HEPES 10 mM/MgCl2 1.5 mM/KCl 10 mM/DTT 0.5 mM/NP40 0.05%/pH 7.9. After a 10 min centrifugation at 3000 rpm and 4°C, pellets were resuspended in HEPES 5 mM/MgCl2 1.5 mM/EDTA 0.2 mM/DTT 0.5 mM/glycerol 26% (v/v)/pH 7.9, and homogenized with 20 full strokes in Dounce. After 30 min incubation on ice, lysates were centrifuged 20 min at 24000 g and 4°C. Supernatants containing nuclear extracts were analyzed by immunoblot.

Immunoblot and Immunoprecipitation

Total lysates or subcellular fractions were processed for immunoblot as described previously [18].

Immunofluorescent staining

Cells were grown on glass coverslips and then treated as described previously [18]. After fixation with PFA 4% sucrose, non-specific sites were blocked for 1 hr at 37°C with 3% BSA

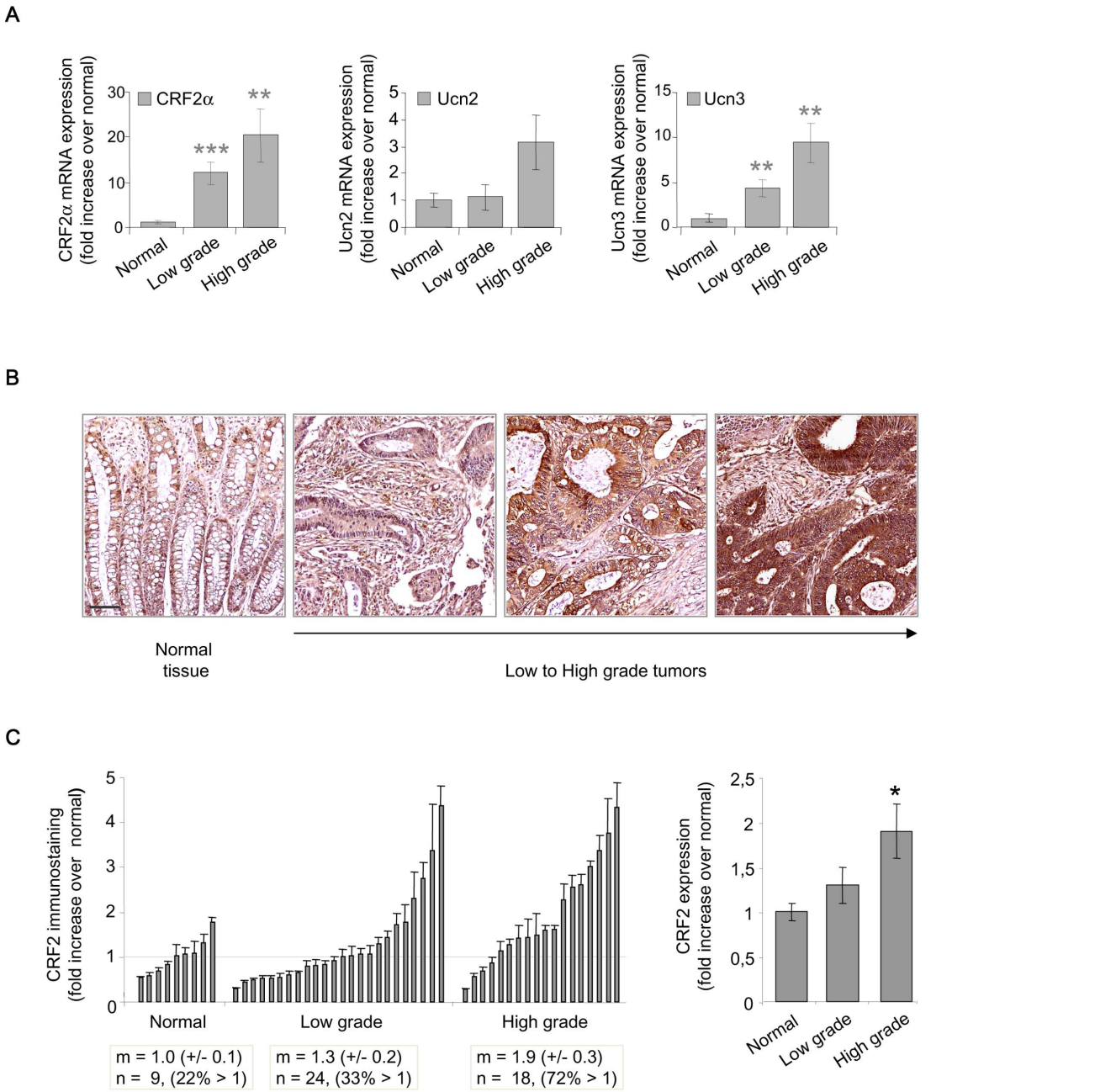


Figure 1. CRF2 and ligand expression are increased in high grade and poorly differentiated human CRC. (A) Histograms representing CRF2α, Ucn2 and Ucn3 transcript expression normalized to the housekeeping gene PGK (phosphoglycerate kinase) in human normal tissues or CRC (low and high grades). (B) Representative CRF2 immunohistochemistry performed on CRC tissues from low to high grade. Scale bar, 50 µm. (C) Histograms representing CRF2 protein expression quantified from immunohistochemistry. Each sample is represented as dark bars +/− SD (left) and the mean value of each group +/− SD (right). High grade is statistically different from normal at *, $p<0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g001

0.5% Tween20. Then cells were incubated for 1 hr at 37°C with specific antibodies which were diluted in the blocking solution at 1:100 for primary and 1:500 for secondary antibodies. Fluorescence photomicrographs were taken with a confocal microscope at the ×100 objective (Leica TCS SPE) or an epifluorescence microscope at the ×100 objective (ZEISS, AvioVert 200M).

RT and qPCR

Total RNA extractions were performed using Trizol™ reagent and 1 µg of total RNA was denaturized and subsequently processed for reverse transcription using M-MLV (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. qRT-PCR were done with a Light cycler 480 and the universal probe library (Roche). Primer sequences and probes are summarized in Table 1.

ECM preparation and cell adhesion

Tissue culture dishes were coated with LM-332 using the following methods: A431 epidermoid cells were cultured to confluence on various surfaces at 37°C to allow for the deposit of LM-332, then cells were removed as previously described

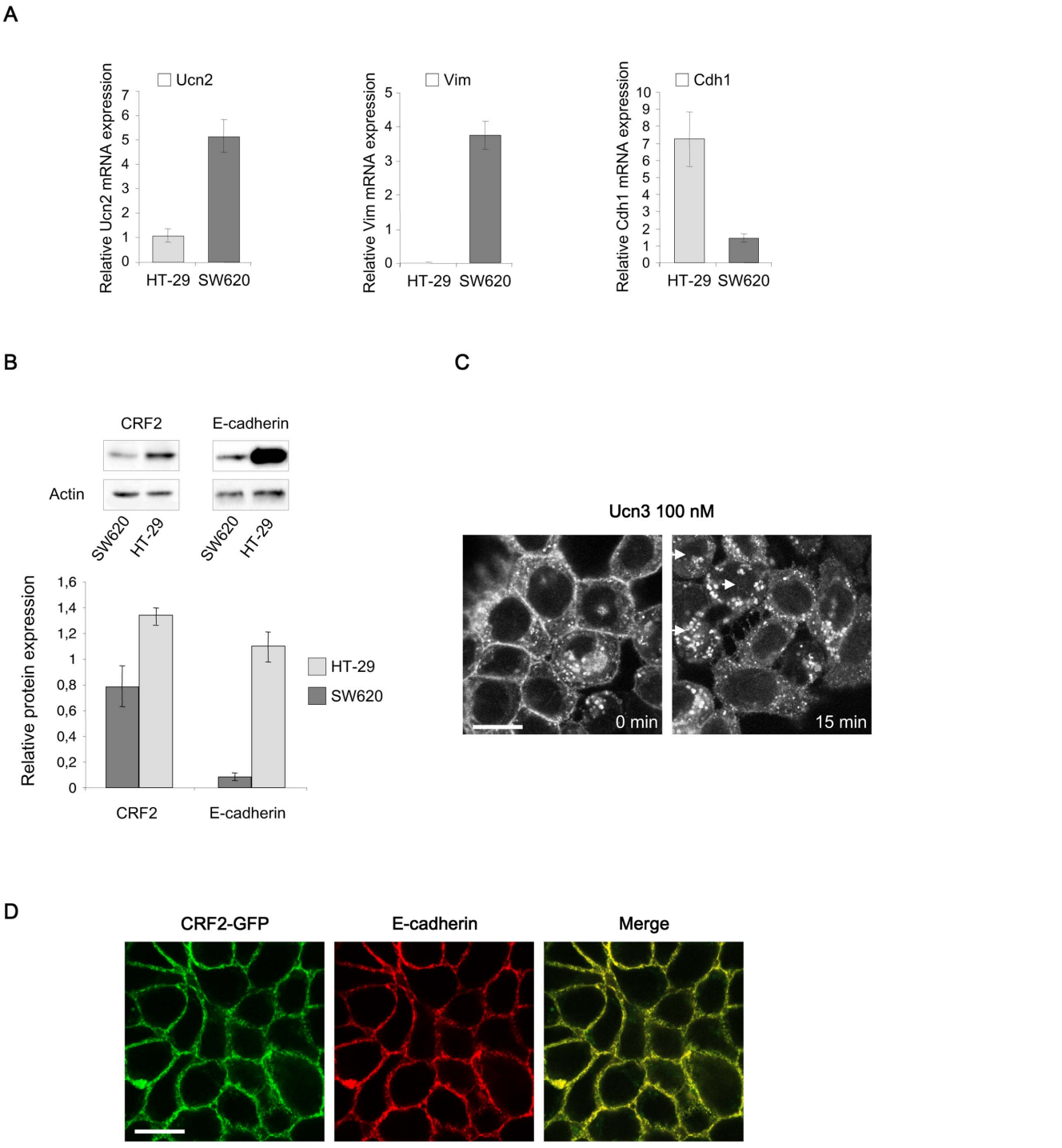


Figure 2. Characterization of CRF2/Ucns and cell differentiation marker expression in CRC cell lines. (A) Characterization of HT-29 and SW620 cell lines by mRNA expression of Ucn2, Vimentin (Vim) and E-cadherin (Cdh1) normalized to the housekeeping gene HPRT (human phosphoribosyltransferase). (B) E-cadherin/actin and CRF2/actin protein expression quantified by immunoblot in SW620 and HT-29 cell lines. (C) Confocal microscopy analysis of CRF2-GFP distribution in Ucn3-treated HT-29 cells. Scale bar, 15 μm. (D) Confocal microscopy analysis of CRF2-GFP and E-cadherin distribution in HT-29 cells. Scale bar, 20 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g002

[19,20]. Briefly, confluent monolayers were sequentially extracted with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS, followed by 2M urea in 1M NaCl. Plates were washed in PBS, incubated with 1%BSA, and stored at −20°C. Human collagen type IV from placenta was obtained from Sigma Aldrich. Coating of plastic Petri dishes (Microtiter plates 96-well, Nunclone; Nunc, Roskilde, Denmark) was performed by overnight incubation with ECM proteins (10 μg/mL) at 4°C. Plates were saturated with 3% (w/v) BSA in PBS for 2 hrs at 37°C. HT-29 CRF2-GFP cells were pretreated or not with 100 nM Ucn3 for 30 min before to be plated (5×10^4

Table 2. Patient's clinicopathological findings.

Age	**Median 75 (16–92)**										
Sex	**F**	**n = 12**									
	M	**n = 18**									
Localization	**Left colon**	**n = 13**									
	Right colon	**n = 17**									
mRNA study		**Cases**	**CRF2α**			**Ucn2**			**Ucn3**		
Characteristics		**(n = 30)**	**Mean**	**SEM**	**pvalue**	**Mean**	**SEM**	**pvalue**	**Mean**	**SEM**	**pvalue**
pTNM	pN0M0	19	12	2,4	0,539	1,1	0,5	**0,038**	4,3	0,9	0,165
	pN1M0	4	28,1	13,8		0,5	0,3		7,8	2,5	
	pN0M1	3	13,4	5,1		5	2,5		11,5	5,7	
	pN1M1	4	18	9,2		4,4	1,5		9,6	4,4	
Lymph node	N0	23	14,8	3,2	0,787	1	0,4	**0,005**	4,9	0,9	0,082
	N1	7	16	5,4		4,7	1,3		10,4	3,2	
Metastasis	M0	22	12,2	2,1	0,26	1,6	0,6	0,527	5,3	1,2	0,205
	M1	8	23	7,9		2,4	1		8,7	2,4	
Grade	Normal	30	1	0,4	**<0,001**	1	0,3	0,157	1	0,4	**<0,001**
	Low	19	12	2,4		1,1	0,5		4,3	0,9	
	High	11	20,4	5,9		3,2	1		9,5	2,2	
Kras/B-Raf	WT	12	14,7	3,4	0,982	2,6	1	0,127	7,7	1,9	0,177
	Mut	17	16,3	4,1		1,2	0,5		4,9	1,2	
MSI	MSS	24	15,1	3,2	0,237	1,2	0,4	**0,019**	5,1	1	0,094
	MSI	5	18,1	4		4,5	2		10,4	3,6	

doi:10.1371/journal.pone.0079335.t002

cells/well) in triplicate in coated 96-well microtiter plates and incubated from 0 to 60 min at 37°C. Non adherent cells were removed by washing three times with PBS, and cell adhesion was estimated by a cell proliferation assay (CellTiter 96 AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega).

Cell transmigration and invasion

HT-29 CRF2-GFP cells were seeded on 24 well transwells (8 μM pore size) (Becton Dickinson). After cell confluence, the culture medium was serum harvested over night in up and down chambers. Transmigration was then initiated by establishment of a serum gradient with 10% FCS in the lower chamber, with or without 100 nM Ucn3 in each chamber. 72 hrs after the initiation of transmigration, cotton swabs were used to remove cells on the upper surface of transwells. After fixation with PFA 4%, migratory cells were stained with Hematoxylin and manually counted under the microscope. The mean values +/− SEM were calculated and analyzed using Student's test.

HT-29 CRF2-GFP cells (2.5 10^{-5}/mL) were placed in the top compartment of a 24-multiwell insert insert plate (BD Falcon) that was separated from the bottom compartment by BD-Matrigel Matrix membrane, with 0.4-μm pore size. Serum-free RPMI with or without Ucn3 (1 μM) were added into the top compartment and 10% FCS into the bottom compartment. After 48 hrs at 37°C in a 5% CO2 atmosphere, cells that had invaded through the Matrigel, were analyzed as described before for the transmigration assay.

Cell viability was evaluated with the CellTiter 96 Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Gelatin degradation assay

About 40 μL (20-30 μg cell protein) harvested culture medium were electrophoresed under nonreducing conditions in a 10% acrylamide gel containing 1 mg/mL gelatine (Sigma-Aldrich), according to the method described by Werb and al., [21]. After electrophoresis, the gels were washed at room temperature for 3×30 min in 2% Triton X-100 and overnight at 37°C in buffer containing 20 MM Tris-HCl (pH 7.7) and 5 mM $CaCl_2$.Thereafter, gels were stained with 0.1% (wt/vol) Coomassie Brillant Blue R-250 in 50% (vol/vol) isopropyl alcohol/10% (vol/vol) glacial acetic acid for 60 min and destained in 20% (vol/vol) isopropyl alcohol/5% (vol/vol) glacial acetic acid.

Densitometric analysis and statistics

Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. All graphs represent the mean value ± SD of protein expression levels measured by densitometric analysis in "Image J" software (NIH). The relative expression levels of mRNA or proteins were determined as follows: the expression of level of each transcript or protein was normalized to i) their housekeeping gene in qPCR or RT-PCR; ii) to actin in whole lysate westernblots or histones in nuclear extract westernblots. In some experiments and in order to display a fold increase over control, the relative expression of transcripts or proteins in control conditions was set to 1. Statistics are unpaired t-test and statistical significance is given by the number of asterisks (*$P<0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$).

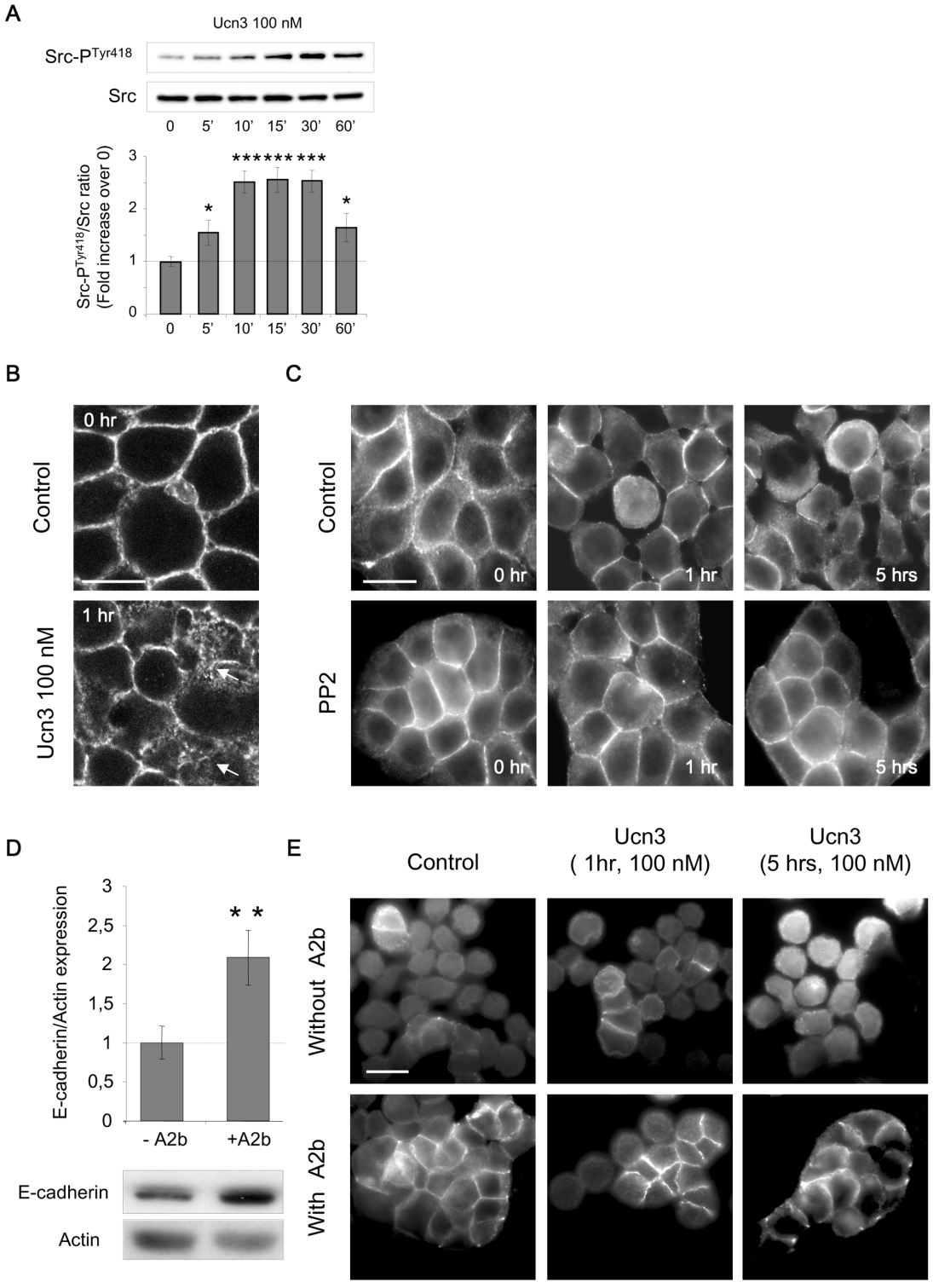


Figure 3. CRF2 signaling disrupts AJ. (A) Immunoblot analysis of Src-P^{Tyr418} and Src total expression in HT-29 cells following the time course of Ucn3 treatment. (B) Confocal analysis of E-cadherin distribution in HT-29 cells pretreated with cycloheximide before Ucn3 treatment. Scale bar, 15 μm. (C) Effect of PP2 (10 μM, 1 hr) on E-cadherin distribution in HT-29 cells treated or not with Ucn3, analyzed by epifluorescence microscopy. Scale bar, 20 μM. (D) Effect of CRF2 antagonist (A2b, 8 nM, 24 hrs) on E-cadherin expression in SW620 cells. Quantification was performed from immunoblots and normalized to actin. (E) E-cadherin distribution in SW620 cells pretreated or not with A2b and further treated or not with Ucn3. Analyzed were performed by epifluorescence microscopy. Scale bar, 10 μM.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g003

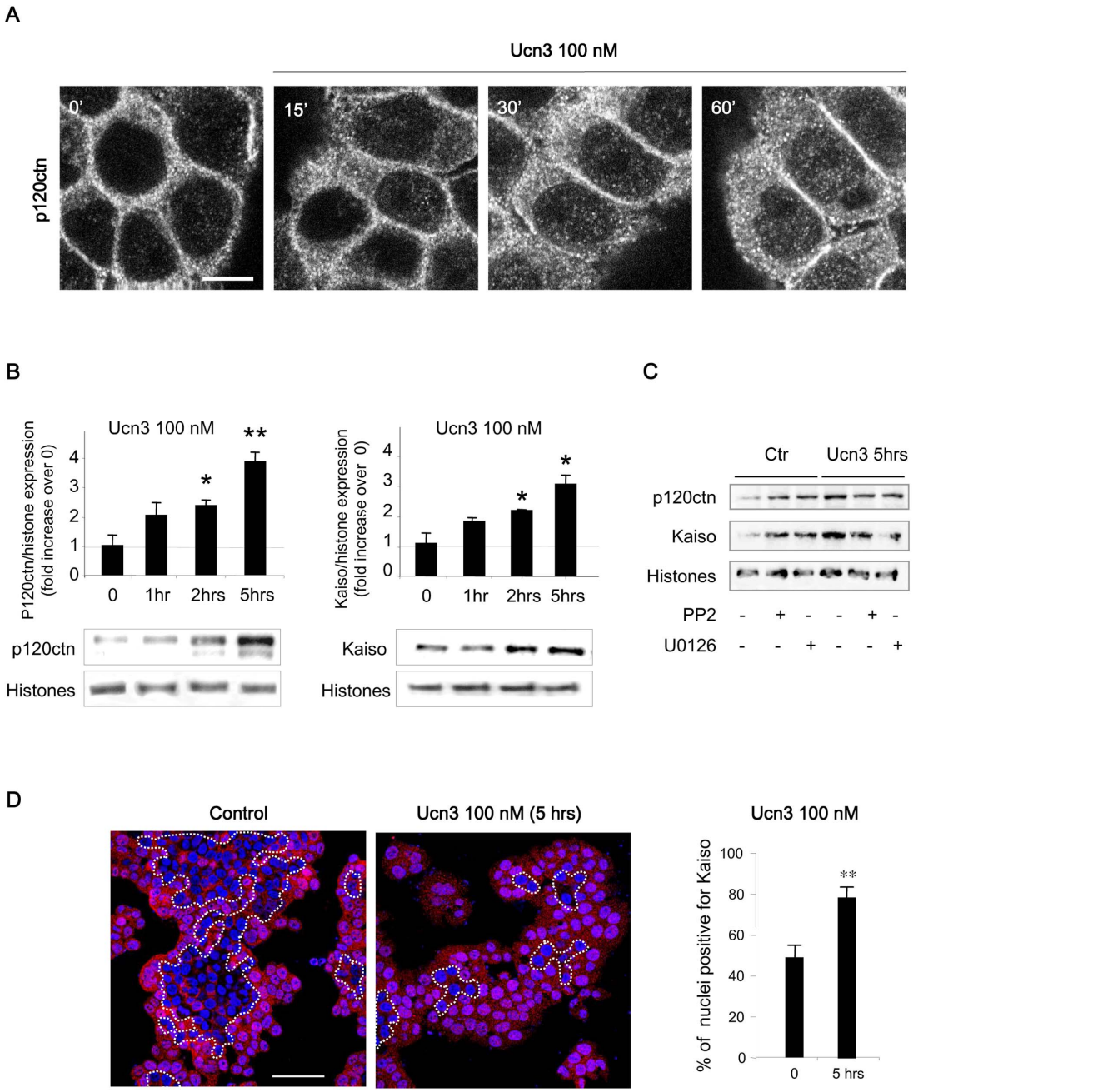


Figure 4. CRF2-mediated dissociation of AJ leads to nuclear shuttling of p120ctn and Kaiso. (A) Confocal analysis of p120ctn location in HT-29 cells pretreated with cycloheximide before Ucn3 treatment. Scale bar, 10 μm. (B) Immunoblot analysis of p120ctn and Kaiso protein expression in nuclear extracts from HT-29 cells treated or not with Ucn3 (expression was normalized to histones). (C) Effects of Src and MEK inhibitors (PP2 and U0126: 10 μM, 1 hr) on p120ctn and Kaiso protein expression in nuclear extracts from HT-29 treated or not with Ucn3. Expression was normalized to histones. (D) Confocal analysis of cellular distribution of Kaiso in HT-29 cells. Nuclei were stained with Topro3. Cells negative for nuclei labeling of Kaiso were circumscribed by a white dotted line. Scale bar, 60 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g004

Results

Expression of CRF2 and its ligands increase with staging in CRC tissues and cell lines

We have first performed qPCR for CRF2α (the major CRF2 isoform of colonic epithelium), [22] and Ucn2/3 in normal and CRC tissues of 30 patients, to better understand their regulation during tumor progression (Figure 1A). The clinicopathological findings of the tumors used in the study are shown in Table 2. Tumors were clustered in low (n = 19, corresponding to stages 1–2) and high (n = 11, corresponding to stages 3–4) grades and standardized to their normal tissues. Statistical analysis revealed a significant increase of CRF2α and Ucn3 mRNA expression in tumors compared to normal tissues according to the tumor grade. There were no significant differences of Ucn2 transcripts in these conditions. However, when the analysis was done in tumors tissues only, a pattern was revealed regarding Ucn2 mRNA expression: Ucn2 transcript levels were increased according to the pNM

status, the lymph node invasion and microsatellite instability (MSI). Finally, CRF2α, Ucn2 and Ucn3 transcript levels didn't correlate to mutations of *K-ras or B-raf*. A similar result was found with CRC cell lines (supplemental Figure S1). Immunohistochemical analysis was used in order to detect CRF2 receptor protein expression in colorectal sections corresponding to normal tissues (n = 9), low grade (n = 24) and high-grade (n = 18) tumors (Figure 1B). The proportion of samples greater than the mean of normal tissues increased from 22% in normal to 33% and 72% in low and high-grade tumors respectively (Figure 1C, left panel). Moreover, the CRF2 protein expression increased according to the tumor grade (ANOVA p = 0.047) (right panel). These results suggest a relationship between CRF2 protein expression and higher tumor grades. We extended our analysis by qPCR in 17 human CRC cell lines (supplemental Figure S1). Interestingly, we found that the expression of CRF2 ligands is inversely correlated to epithelial differentiation markers like E-cadherin (*Cdh1*) but correlated to mesenchymal makers like vimentin (*Vim*), suggesting a role of CRF2 in the cellular disorganization observed during tumor progression. Two CRC cell lines were selected: i) HT-29 cells, which express high level of E-cadherin but low level of Ucn2 and no vimentin; ii) SW620 cells, poorly differentiated mesenchymal cells which express high levels of Ucn2 and vimentin compared to a weak level of E-cadherin (Figure 2A). The expression of CRF2 and E-cadherin at the protein level was confirmed by immunoblotting (Figure 2B). Using HT-29 cells that stably overexpress the CRF2 coupled to GFP protein (HT -29 CRF2-GFP cells) we observed that CRF2-GFP was predominantly localized at the membrane, in intercellular contacts (Figure 2C). This observation was further supported by microscopy confocal analysis showing a co-localization of CRF2-GFP protein with E-cadherin in HT-29 cells (Figure 2D). With Ucn3 (the most efficient CRF2 agonist in HT-29 cells, see supplemental Figure S2), cells contacts were altered and CRF2-GFP shifted in cytoplasmic vesicles (Figure 2C).

Altogether, these data indicate that CRF2 and its ligands are expressed in human CRC and cell lines according to the tumor grade and/or differentiation status. CRC cells could activate their CRF2 via an autocrine production of ligands, especially in undifferentiated cell lines.

Regulation of cell-cell contacts by CRF2 signaling

CRF2 signalization has been recently extended to non canonical G PROTEIN COUPLED RECEPTOR pathways, including Src kinase which directly interacts with the endocytosed CRF receptors and takes part in the activation of ERK [23,24]. Src-P^{Tyr418} expression was progressively increased from 5 to 30 min, while the total Src remained unchanged (Figure 3A). The phosphorylated form of Src has been co-immunoprecipitated with CRF2 during the early stage of the kinetic (supplemental Figure S3). In CRC, Src kinase activation correlates to E-cadherin disturbance, histological grading and poor prognosis [25]. We thus investigated the involvement of Src activity in Ucn3-mediated cell dissociation. In HT-29 cells, confocal microscopy analysis showed that E-cadherin staining produced a honeycomb like pattern at the lateral membrane cortex (Figure 3B). Activation of CRF2 by Ucn3 rapidly altered this pattern. Only a thickened and disrupted linear membrane staining persisted while numerous cytoplasmic accumulations appeared, indicating an endocytosis of E-cadherin associated to AJ disruption. Cycloheximide was used to prevent the accumulation of neosynthesized E-cadherin. Internalization assays using HECD-1 antibodies were done to confirm the Ucn3-induced E-cadherin endocytosis (Figure supplemental S4). Cell dissociation and endocytosis of E-cadherin, upon Ucn3 exposure was prevented by pre-treatment with the Src family inhibitor PP2, indicating that Src activation was required for the Ucn3-mediated cell-cell contacts disruption (Figure 3C). In SW620 cells, which express low level of E-cadherin and perform few AJ, blockade of CRF2 signaling by its specific agonist astressin2b (A2b) for 24 h was responsible of an increased expression of E-cadherin (Figure 3D). Immunofluorescence analysis of E-cadherin distribution in SW620 cells showed weak membrane expression and cell-cell contacts with or without Ucn3 (Figure 3E). In presence of A2b, SW620 cells formed clusters and E-cadherin was localized at the cell-cell contacts. Ucn3 slightly reversed A2b-induced cell clustering. Modulation of adhesive proprieties of SW620 cells were also evidenced in aggregation assays, showing that both adherent and non adherent cells were able to aggregate in presence of A2b (supplemental Figure S5).

E-cadherin is associated with catenins at AJ complexes. Disruption of cell-cell contacts leads to AJ proteins dissociation and cytoplasmic and/or nuclear localization of catenins, which promote cell invasion in CRC [26]. In HT-29 cells treated with Ucn3, p120ctn was accumulated in the cytoplasm and the nucleus (Figure 4A). In the nucleus, p120ctn has been described to regulate the activity of the transcription factor Kaiso. Ucn3 significantly increased p120ctn and Kaiso nuclear expression as observed by immunoblotting after nuclear fractionation (Figure 4B). To identify the signaling molecules involved in this nuclear shuttling, we tested the effect of Src (PP2) and MEK (U0126) inhibitors. As shown on Figure 4C, we found that these inhibitors reversed the Ucn3-induced nuclear accumulation of these proteins. They also induced an increase of basal nuclear expression of p120ctn and Kaiso, probably due to their toxic effect. The nuclear distribution of Kaiso was further analyzed by confocal microscopy (Figure 4D). The percentage of nuclei positive for Kaiso increased about 40% in HT-29 cells treated with Ucn3. Interestingly, in control cells, cells corresponding to nuclei positive for Kaiso were observed at the periphery of the cluster, which corresponds to cells with less intercellular contacts. Under Ucn3, cells at the centre of the cluster became positive for nuclei labeling of kaiso.

Taken together our data indicate that CRF2 signals through a Src pathway to induce AJ disruption by E-cadherin endocytosis. This is followed by p120ctn and Kaiso nuclear translocation. Through this route, CRF2 may participate in cell dedifferentiation and migration.

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

Cancer cell migration is required for metastasis and results from the reorganization of cell-cell and cell-matrix contacts. Ucn3-induced cell dissociation was also associated with cell shape remodeling as observed by actin cytoskeleton staining with phalloidin-TRITC at the basal pole of HT-29 cells (Figure 5A). In untreated cells, actin was distributed at the cell periphery and organized as stress fibers spread across the cells. With Ucn3, the actin staining was less intense at the cell periphery where contacts are dissociated. There were also fewer stress fibers, which appeared shorter and more fragmented. The remodeling of cell shape is driven by intra-cellular kinases signaling. In this line, the ERK pathway has also often been activated in response to CRF2 activation. In HT-29 CRF2-GFP cells, we showed that ERK was phosphorylated on Tyr^{204} in a short time frame after Ucn3 exposure (Figure 5B). The ratio of phosphorylated/total ERK was increased by a 2.5 fold between 5 and 15 min and returned to its basal level at 30 and 60 min. PP2, reversed the ERK activation induced by Ucn3 without changing its basal level (low panel). The MEK inhibitor, U0126, induced the loss of the phosphorylated

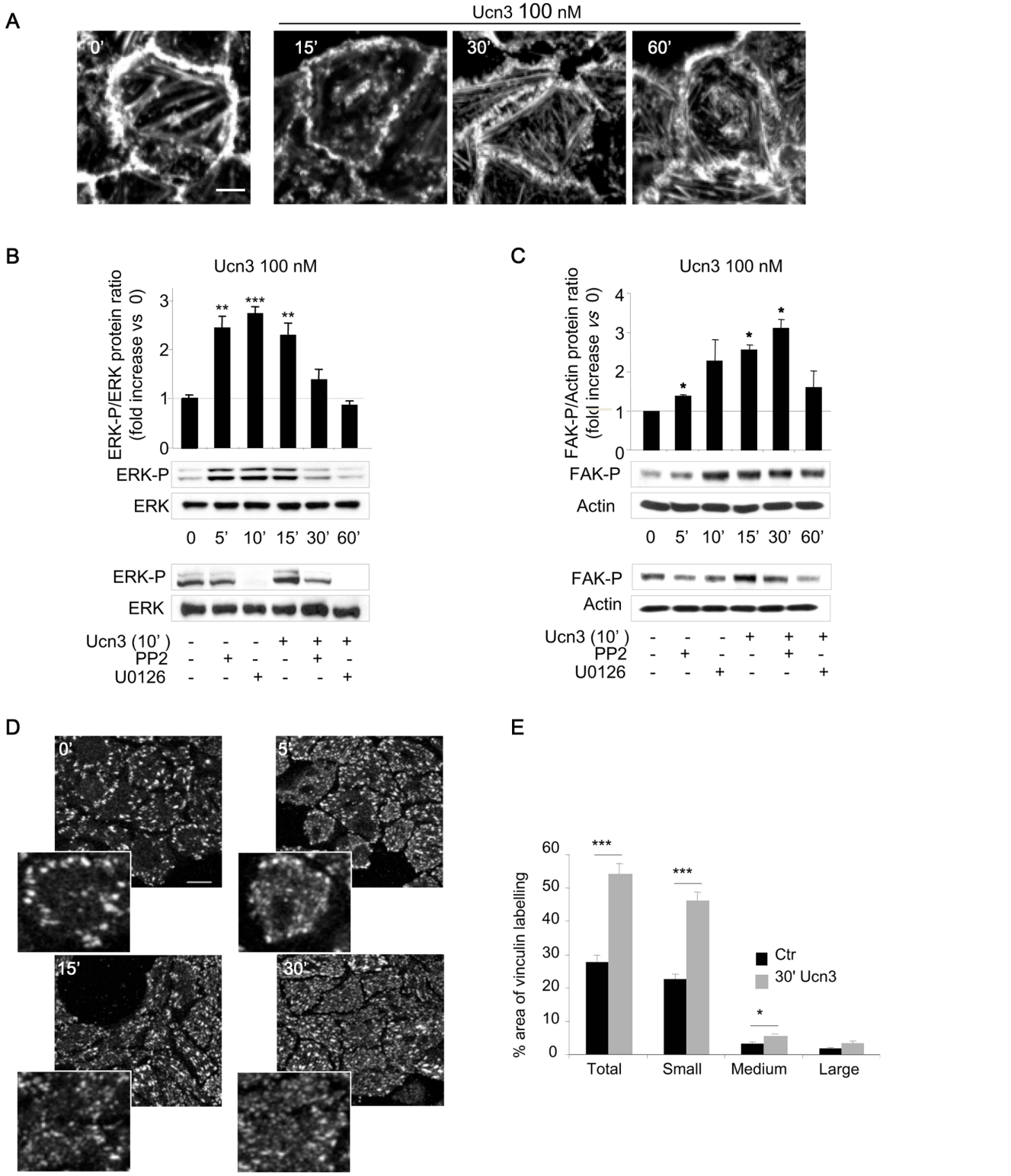


Figure 5. CRF2 signaling reorganizes cell-matrix contacts. (A) Phaloidin-TRITC fluorescence is analyzed by confocal microscopy at the basal pole of HT-29 CRF2-GFP cells following Ucn3 treatment. Scale bar, 5 μm. (B) ERK-P^{Tyr204}/ERK total ratio quantified from immunoblot in HT-29 cells treated with Ucn3 (0 to 60 min) (Upper panel). Effects of Src (PP2: 10 μM, 1 hr) or MEK (U0126: 10 μM, 1 hr) inhibitors on Ucn3 induced ERK-P^{Tyr204} (Lower panel). (C) Ucn3-mediated phosphorylation of FAK- P^{Ser910} in HT-29. Quantifications were performed from immunoblots and normalized to actin (upper panel). Effects of Src (PP2, 10 μM, 1 hr) and ERK (U0126, 10 μM, 1 hr) inhibitors on Ucn3 induced FAK-P^{Ser910} (Lower panel). (D) Confocal analysis of vinculin distribution at the basal pole of HT-29 following Ucn3 treatment. Scale bar, 20 μm. (E) Quantification of the patch number by size at 30 min of Ucn3 treatment.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g005

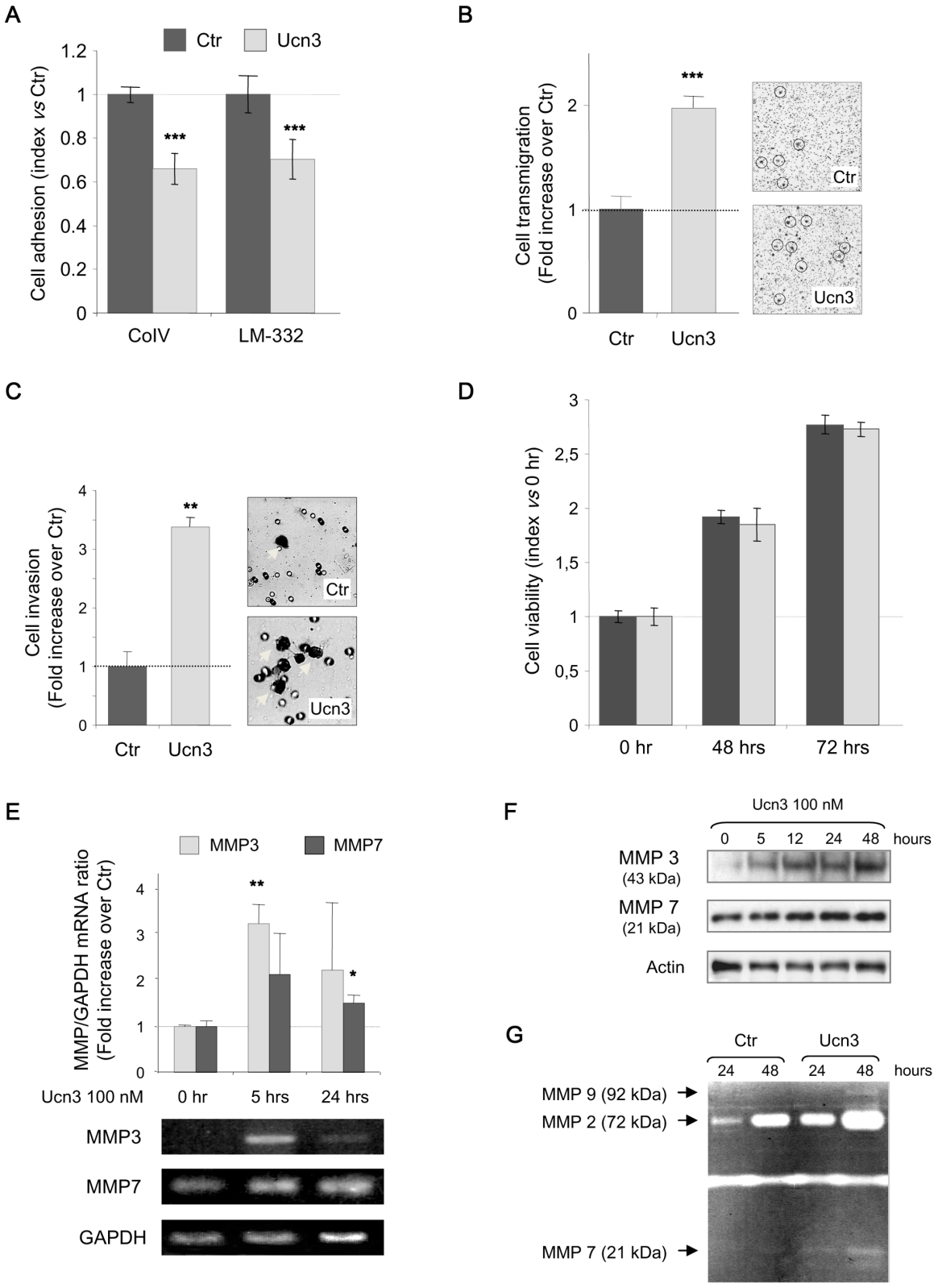


Figure 6. CRF2 signaling alters cell adhesion in favor to cell migration and invasion. (A) HT-29 were treated or not with Ucn3 (100 nM) 30 min before adhesion and then plated on either COIV or LN-332. Cell-ECM adhesion was evaluated at 60 min with the use of a Cell Titer Aqueous MTT reagent kit. Values are normalized to the adhesion without Ucn3. Data represent the mean +/− SEN of 4 separate experiments. Effect of Ucn3 on HT-29 cells transmigration after 72 hrs was determined using a transwell assay (B) and on HT-29 cell invasion after 48 hrs by a matrigel assay (C). In both assays cells were visualized by phase contrast microscopy and counted. A phase contrast image has been joined. A circle has indicated some migrating cells and some invaded cells have been indicated by a white arrow. Data (n>3) are given as mean +/− SEM. (D) Effects of Ucn3 on HT-29 cell viability. (E) Regulation of MMP3 and MMP7 mRNA expression analyzed by RT-PCR in HT-29 cells treated with Ucn3 100 nM. (F) Immunoblot

analysis of MMP3 and MMP7 protein expression in HT-29 cells following the time course of Ucn3 treatment. (G) Zymogram of gelatinolytic activities in supernatant of HT-29 cells treated or not with Ucn3 (100 nM) during 24 and 48 hrs.
doi:10.1371/journal.pone.0079335.g006

forms of ERK under basal conditions and after Ucn3 treatment. Cell adhesion remodeling and migration involves the focal adhesion (FA) kinase (FAK). This kinase could be phosphorylated on Ser^{910} by the ERK Ser/Thr kinase. We have thus determined the level of FAK phosphorylation in HT-29 CRF2-GFP cells exposed to Ucn3 (Figure 5C). FAK P^{Ser910} was transiently increased with a maximum at 30 min. This phosphorylation was slightly inhibited by PP2 and U0126 under basal conditions and abolished under Ucn3 treatment. These data suggest that Ucn3 activates a Src/ERK/FAK phosphorylation cascade through the CRF2 receptor.

Focal adhesion structures, which are regulated by FAK, participate in cell-ECM interactions. These interactions are mediated by various transmembrane receptors such as integrins, linked to cytoskeleton components and scaffold molecules like vinculin [27]. We analyzed the effect of Ucn3 on FA through the distribution of vinculin (Figure 5D). Without Ucn3, vinculin was expressed in strong patches distributed mainly at the cell periphery. With Ucn3, smaller punctuated claws appeared in vinculin staining that were homogeneously distributed all over the cell and still not restricted at the periphery, especially at 30 min. The quantification of these patches by size revealed that small patches increased while large remain unchanged (Figure 5E). This label suggests the formation of nascent focal contacts, which have been previously described to participate in cell adhesion and migration [28]. We have performed cell adhesion experiments in order to test if the Ucn3-induced vinculin reorganization could alter cell attachment to collagen IV (CoIV) and laminin 332 (LM-332) (two major ECM proteins of colon's basal lamina) (Figure 6A). Ucn3 decreases HT-29 cell adhesion on these two matrix components at 20 and 60 min of plating. To determine if this effect was associated to migration and/or to invasion we tested the impact of Ucn3 on HT-29 cell motility by transwell migration and Matrigel invasion assays (Figures 6B and C). Ucn3 treatment significantly increased the level of cell migration and invasion compared to control cells. This effect was not supported by modification of cell viability (Figure 6D), but could be regulated by secretion of matrix metalloproteases (MMPs). We hence examined the expression and the activity of MMPs. As shown in Figure 6E, mRNA levels for MMP3 and MMP7 were found to be transiently increased by Ucn3. We didn't observed significant modulation of MMP2 and MMP9 transcripts (data not shown). These results were confirmed at protein levels (Figure 6F). We next examined by a gelatin degradation assay, if HT-29 cells secreted functionally active MMPs that have been reported to play a role in carcinoma invasion through extracellular matrix degradation. As shown in Figure 6G, MMP enzyme activity was present in unstimulated cell line supernatants, and stimulation with Ucn3 resulted in an increase in MMP activity.

Altogether, these data indicate that CRF2 signaling induced important cell adhesion remodeling. At the basal pole, ECM and cell-matrix contacts are remodeled, leading to a decreased adhesion on CoIV and LM-332 substratum. These modifications favor cell migration and invasion and provide evidence that CRF2 signaling may contribute to invasive phenotype of CRC.

Discussion

The CRF2/Ucns system is up-regulated in high grade CRC. Our *in vitro* data highlight the functional relevance of this CRF2 over-signaling in the regulation of cell adhesion that contribute to epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like process with enhance migration and invasion.

CRF receptors and ligands are expressed in many types of cancers and cancer cell lines [29,30]. Their inappropriate secretion is sometimes correlated with tumor aggressiveness [31]. However no value as tumor marker has been found for CRF receptors in lung and breast cancer respectively, whereas in endometrial cancer, CRF1 expression is correlated with less aggressive tumors, whereas CRF2 expression is increased in the cytoplasm of advanced stage tumor cells [32]. In the colon, we found that CRF2 expression (at transcript and protein levels) was increased in CRC according to their grade and/or differentiation status. Likewise Ucn2/3 are overproduced in high-grade tumors and there is a balance between Ucn2 expression and epithelial markers observed in CRC cell lines suggesting that an autocrine activation of CRF2 could take part in the progression of CRC cells.

Thus it is clear that the two CRF receptors exhibit different distributions (cellular and subcellular) and hold distinct roles in cancer cells, which could even be counteracting. CRF signaling, in particular CRF1, has been described to regulate either tumor initiation and progression or tumor inhibition, affecting cell proliferation, apoptosis or tumor angiogenesis (for review [15,33]) while CRF2 may play a role in the invasiveness [16,34]. In this work, we first described that CRF2 may also contribute to an EMT-induced cell disorganization and dedifferentiation that could be associate to metastatic progression. Indeed, in HT-29 cells, we found that CRF2 activation induced weakness and disruption of AJ, a process associated to the endocytosis of E-cadherin expression and to the nuclear localization of p120ctn and Kaiso. Inversely, in SW620 cells, which express low level of E-cadherin, blockade of CRF2 autocrine activation by A2b induces E-cadherin re-expression and cell clustering. Src kinase activity is increased in many CRC and has been described to trigger cell-cell junction disassembly [35] and induce nuclear translocation of p120ctn in tumor cells lacking E-cadherin [5,36]. An association between Src and CRF1 following short-term treatment with Ucn has been initially described in cardiomyocytes and plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection [23]. We observed that Src is rapidly activated (phosphorylation on tyr418) and recruited to CRF2 in response to Ucn3 signaling. Pretreatment with PP2 abolished Ucn3-induced disruption of cell-cell contacts and p120ctn/Kaiso nuclear translocation suggesting an active role of Src in these effects. P120ctn nuclear translocation could relieve Kaiso-mediated repression of several cancer-related genes, such as MMP7 or Wnt11 (for review [7]). In addition to its repression activity, Kaiso also contains enhancer motifs in which the function of p120ctn binding is unknown [37]. We found that Ucn3 induced both the regulation of p120ctn/Kaiso nuclear ratio and the transcription of MMP3 and MMP7. These results were confirmed at protein levels. Ucn3 also induced a secretion of MMP2 and MMP9 in cultured medium measured by zymography. However MMP2 and MMP9 mRNA expression was unaffected by Ucn3 under the conditions of our experiments, indicating that Ucn3 may also regulate MMP production at the level of posttranslational processing. A similar regulation of MMP9 by Ucn has been described in cultured cells from human placenta [38]. During cancer progression, these MMP enhance cell

migration and invasion by degrading ECM components [39] or extracellular fragment of E-cadherin, thus disrupting AJ [40].

Elevated nuclear levels of Kaiso are frequently seen in human cancers including CRC and Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer [41]. Interestingly, invasive cells at the border of the tumor have increased levels of nuclear Kaiso [42]. In HT-29 cells, cells positive for nuclear kaiso were principally found at the periphery of the cell cluster. Under Ucn3, positive cells for nuclear kaiso reached the center of cell cluster. The nuclear localization of kaiso that correlates to reduction of contacts with the cell matrix or surrounding cells could represent an indicator of cell adhesion dynamic. Our *in vitro* assays establish conditions that activate colon cancer cell motility through a Src/ERK/FAK pathway, thus supporting a role for CRF2 signaling in tumor progression and metastasis. These observations would need to be supported by *in vivo* assays. In CRC, transient ERK activation seems to be sufficient to induce FAK phosphorylation on Ser^{910} and subsequent migration and metastasis [43,44]. In HT-29 cells, the CRF2 is also responsible for a transient increase in ERK activation that leads to FAK-P^{Ser910}. Furthermore, activated Src is required to activate ERK, since PP2 also abolished Ucn3-induced phosphorylation of ERK. This signaling could modulate the association of FAK with the scaffold protein paxillin [45], which regulates the FA turnover and actin cytoskeleton plasticity at the basal pole of the cell. Structurally, we found that CRF2 activation leads to a decrease of organized stress fibers in favor of shorter and less polarized ones. This cytoskeleton reorganization occurs concomitantly with the decrease of cell adhesion on ECM and the formation of small vinculin patches. This is in agreement with smaller patches of paxillin and vinculin observed in metastatic-derived cell lines (SW620) compared to their primary tumor-derived cell lines (SW480) [28]. Previous studies have demonstrated that the alteration of FA complexes is involved in the transmigration of SW480 and HT-29 cells [46]. The CRF2-induced impairment of AJ combined to FA complexes remodeling could favor HT-29 cell transmigration.

Stress participates in the development and aggravation of gastrointestinal disorders (for review [47,48]). Indeed CRF2 and its ligands are overexpressed in the colon of inflammatory bowel diseases patients while AJ protein expression is altered [49]. We found that similar CRF2-dependent cell adhesion alterations occur in tumor cells thus providing a new role of stress-related CRF system in CRC. Overall, our data suggest that Ucn3 stimulates cell motility and invasiveness of HT-29 cells most probably *via* induction of FAK phosphorylation and actin filament reorganization. Based on these findings we postulate that the stress neuropeptide Ucn3 present in the vicinity of tumors (either produced locally by the tumor cells themselves or by nearby normal cells or secreted from the innervations of surrounding tissues) could promote an EMT-like process and play an important role on colon cancer cell metastatic capacity, providing a potential link between stress and tumor progression. According to its potential implication in growth, angiogenesis, migration and metastasis, *via* activation of locally expressed ligands, the CRF2 could be clinically exploited as a target for new therapeutic approaches.

Supporting Information

Figure S1 CRF2 expression is inversely correlated to cell differentiation markers in CRC cell lines. Correlated mRNA expression of Ucn2 with Vimentin (Vim), E-cadherin (Cdh1) and Keratin 20 (Krt20) in 17 CRC cell lines, normalized to the house keeping gene HPRT (human phosphoribosyltransferase).
(TIF)

Figure S2 Adenylyl cyclase-dependent production of cAMP in HT-29 cells. cAMP production +/− SD by HT-29 cells treated with 1 μM CRF, Ucn2 or Ucn3 in presence of 1 μM of astressin2b (A2b) (gray bars) or not (dark bars). At the concentration of 1 μM, CRF, Ucn2 and Ucn3 induced respectively 0.5, 1.0 and 2.4 pM of cAMP/10^5 cells, which was completely reversed by A2b, a selective CRF2 antagonist. *Method*: Cells were treated as described; lyzed in 0.1 M HCl, centrifuged (600 g 20 min at RT) and supernatant were quantified for cAMP using the ELISA kit: Correlate^{TM} EIA (Assay designs) according to the manufacturer's instructions. All experiments were done in triplicates.
(TIF)

Figure S3 Interaction between SrcP^{Tyr418} and CRF2 receptor. (A). The association between Src-P^{Tyr418} and CRF2 has been tested by co-immunoprecipitation experiments CRF2 was immunoprecipitated from total lysate of Ucn3-treated HT-29 cells and levels of Src-P^{Tyr418} and CRF2 were detected by immunoblots. (B) Confocal analysis of CRF2-GFP (green) and Src-P^{Tyr418} (red) distribution in HT-29 CRF2-GFP treated with 100 nM Ucn3 (left). Scale bar, 10 μM. Quantification of CRF2-GFP and Src-P^{Tyr418} co-localization (right). * are statistics vs t = 0 and $ are statistics versus 5 min of Ucn3. CRF2/Src-P^{Tyr418} interaction was increased after 5 and 10 min of exposure to Ucn3. Furthermore, confocal microscopy analysis indicated a 6-fold increase (at 5 min) in the % of CRF2-GFP co-localized with Src-P^{Tyr418} at the basal pole of HT-29 CRF2-GFP cells in presence of Ucn3. *Methods*: For immunoprecipitation experiments cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktails. An equal volume of each condition was immunoprecipitated using the PureProteome^{TM} Protein A and Protein G Magnetic beads kit (Millipore) according to manufacturer's instructions. Mouse and Rabbit Trueblot antibodies used as secondary antibodies in immunoprecipitation experiments were from eBioscience (Cliniscience, Montrouge, France).
(TIF)

Figure S4 Ucn3-induced E-cadherin endocytosis. A) Confocal analysis of E-cadherin endocytosis. HECD-1 antibodies directed against the extra-cellular domain of the E-cadherin in HT-29 CRF2-GFP treated (right) or not (left) with Ucn3 100 nM. Scale bar, 5 μm. B) Westernblot analysis of E-cadherin and p120ctn according to a time course of Ucn3 (100 nM). *Methods*: Coverslips were incubated at 4°C with the HECD-1 antibody diluted at 1:100 in PBS. After 1 h, unspecific binding was removed with three PBS washes and coverslips were returned to the initial cell culture condition, with or without Ucn3. As mentioned, cells were washed on ice with PBS/NaCl 0.5M/Acetic acid 0.5M/Azide 10 mM to remove antibodies associated with extracellular cadherins. Coverslips were then treated like immunofluorescence.
(TIF)

Figure S5 Blockade of CRF2 signaling induces cell aggregation. Effect of A2b (1 μM, Overnight) on cell clustering in culture conditions (left) and on cell aggregation assays (right). *Method*: HT-29 cells were harvested from monolayer cultures as previously described by (Nakagawa and Takeichi, 1995). To preserve the integrity of E-cadherins at the cell surface, cells were resuspended at a density of 10^6 cells/ml of TBS containing 10 mM HEPES/1 mM CaCl2. Aggregation assays were performed in a 24-well plate saturated with BSA and extensively washed. The cell

suspensions were incubated at 37°C in a gyratory shaker at 75 rpm for 30 min. Cell aggregation was observed with an inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) under phase contrast and photographs were taken with a CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd.). *Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. Development* ***121****, 1321–32.*
(TIF)

Acknowledgments

The authors thank Brigitte Peyrusse, Patrick Meresse and Carole Carcenac for their excellent technical assistance. B. Ducarouge and M. Pelissier-Rota are the recipients of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BD MJS. Performed the experiments: BD MPR ML NC YV MJS. Analyzed the data: BD MJS. Contributed reagents/materials/analysis tools: BB JYS. Wrote the paper: BD BB MJS.

References

1. Schneider MR, Dahlhoff M, Horst D, Hirschi B, Trulzsch K, et al. (2010) A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. PLoS One 5: e14325.
2. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2008) The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. Anticancer Res 28: 3815–3826.
3. Reynolds AB, Carnahan RH (2004) Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. Semin Cell Dev Biol 15: 657–663.
4. Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, et al. (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. J Cell Biol 148: 189–202.
5. van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F (1999) Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 7980–7985.
6. Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. Mol Cell Biol 19: 3614–3623.
7. van Roy FM, McCrea PD (2005) A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? Nat Rev Cancer 5: 956–964.
8. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM (2005) Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. Cancer Res 65: 10938–10945.
9. Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting tumours in context. Nat Rev Cancer 1: 46–54.
10. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science 213: 1394–1397.
11. Grace CR, Perrin MH, Cantle JP, Vale WW, Rivier JE, et al. (2007) Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. J Am Chem Soc 129: 16102–16114.
12. Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J, Vale W (1986) Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. Brain Res 381: 49–57.
13. Ducarouge B, Jacquier-Sarlin M (2012) Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier: Link to inflammation and cancer. Trends in Cell & Molecular Biology.
14. Kiank C, Tache Y, Larauche M (2010) Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. Brain Behav Immun 24: 41–48.
15. Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Chemonidou MC, Constantinidis TC, Lambropoulou M, et al. (2010) Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. Neuropeptides 44: 355–361.
16. Androulidaki A, Dermitzaki E, Venihaki M, Karagianni E, Rassouli O, et al. (2009) Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. Mol Cancer 8: 30.
17. Chartier NT, Laine MG, Ducarouge B, Oddou C, Bonaz B, et al. (2011) Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. Exp Cell Res.
18. Chartier NT, Laine M, Gout S, Pawlak G, Marie CA, et al. (2006) Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. J Cell Sci 119: 31–46.
19. Wayner EA, Gil SG, Murphy GF, Wilke MS, Carter WG (1993) Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes. J Cell Biol 121: 1141–1152.
20. Weitzman JB, Pasqualini R, Takada Y, Hemler ME (1993) The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and homotypic cell aggregation. J Biol Chem 268: 8651–8657.
21. Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. J Cell Biol 109: 877–889.
22. Muramatsu Y, Fukushima K, Iino K, Totsune K, Takahashi K, et al. (2000) Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. Peptides 21: 1799–1809.
23. Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, et al. (2010) Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. Mol Cell Endocrinol 325: 1–7.
24. Van Kolen K, Dautzenberg FM, Verstraeten K, Royaux I, De Hoogt R, et al. (2010) Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. Neuropharmacology 58: 135–144.
25. Van Aken J, Cuvelier CA, De Wever N, Roels J, Gao Y, et al. (1993) Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. Pathol Res Pract 189: 975–978.
26. Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. Science 307: 1904–1909.
27. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, et al. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J Cell Biol 131: 791–805.
28. von Wichert G, Krndija D, Schmid H, Haerter G, Adler G, et al. (2008) Focal adhesion kinase mediates defects in the force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton linkages in metastatic colon cancer cell lines. Eur J Cell Biol 87: 1–16.
29. Arcuri F, Cintorino M, Florio P, Floccari F, Pergola L, et al. (2002) Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. Prostate 52: 167–172.
30. Shahani S, Nudelman RJ, Nalini R, Kim HS, Samson SL (2010) Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. Diagn Pathol 5: 56.
31. Minas V, Rolaki A, Kalantaridou SN, Sidiropoulos J, Mitrou S, et al. (2007) Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. Br J Cancer 97: 637–645.
32. Miceli F, Ranelletti FO, Martinelli E, Petrillo M, Scambia G, et al. (2009) Expression and subcellular localization of CRH and its receptors in human endometrial cancer. Mol Cell Endocrinol 305: 6–11.
33. Wang J, Li S (2007) Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? Biochem Biophys Res Commun 362: 785–788.
34. Olson MF, Sahai E (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. Clin Exp Metastasis 26: 273–287.
35. Summy JM, Gallick GE (2003) Src family kinases in tumor progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev 22: 337–358.
36. Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB (2003) Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. J Cell Sci 116: 4201–4212.
37. Rodova M, Kelly KF, VanSaun M, Daniel JM, Werle MJ (2004) Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. Mol Cell Biol 24: 7188–7196.
38. Li W, Challis JR (2005) Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. J Clin Endocrinol Metab 90: 6569–6574.
39. Zucker S, Vacirca J (2004) Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev 23: 101–117.
40. Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, et al. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci 114: 111–118.
41. Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, et al. (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. Mol Cell Biol 26: 199–208.
42. Soubry A, van Hengel J, Parthoens E, Colpaert C, Van Marck E, et al. (2005) Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment. Cancer Res 65: 2224–2233.
43. Jiang X, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2007) Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells. Cell Signal 19: 1000–1010.
44. Li LH, Zheng MH, Luo Q, Ye Q, Feng B, et al. (2010) P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. Int J Oncol 37: 951–962.
45. Hunger-Glaser I, Salazar EP, Sinnett-Smith J, Rozengurt E (2003) Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. J Biol Chem 278: 22631–22643.

46. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Yoshioka T, et al. (2011) Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. Eur J Pharmacol 650: 145–150.
47. Larauche M, Kiank C, Tache Y (2009) Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. J Physiol Pharmacol 60 Suppl 7: 33–46.
48. Tache Y, Bonaz B (2007) Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. J Clin Invest 117: 33–40.
49. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, et al. (1998) Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. J Pathol 185: 413–418.

Discussion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude met en évidence les rôles pro-inflammatoire et pro-tumoral de la signalisation induite par l'activation du CRF2 (Figure 57).

En effet, l'activation du CRF2 par son ligand l'Ucn3 induit une perte des contacts intercellulaires qui entrainent :

- une augmentation de la perméabilité para- et –trans- cellulaire favorable au développement du processus inflammatoire ;
- un retard dans la différenciation cellulaire pouvant conduire, soit à une altération de structure de l'axe crypto-villositaire, soit à la dédifférenciation cellulaire ;
- une réorganisation des interactions cellules-MEC favorisant la migration et l'invasion cellulaire et donc le développement tumoral.

Localisation du récepteur CRF2 :

Le système CRFergique est un élément central des altérations induites par le stress. La neuro-hormone, le CRF, a initialement été décrite comme étant synthétisée au niveau du SNC et libérée en périphérie. On sait maintenant qu'elle peut également être produite en périphérie et avoir une action paracrine et autocrine (Larauche et al., 2009). L'expression des récepteurs au CRF et de leurs ligands a été décrite au niveau du tube digestif et plus particulièrement au niveau du SNE, des vaisseaux sanguins entériques et des cellules immunitaires de la muqueuse (Buckinx, Adriaensen, Nassauw, & Timmermans, 2011; Larauche et al., 2009). Le CRF2 est également exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales : il serait localisé dans les 2/3 supérieurs des cryptes au niveau du côlon (Chatzaki et al., 2004). Cependant, la localisation du récepteur à la membrane plasmique des cellules épithéliales n'est pas définie : elle peut être apicale (Chatzaki et al., 2004) ou baso-latérale (Moss et al., 2007).

Nous avons mis en évidence une localisation au pôle basal du CRF2 grâce à des expériences de microscopie confocale sur coupe de côlon de rat Sprague-Dawley. Des résultats préalables *in vitro* ont mis en évidence une localisation baso-latérale de ce récepteur dans les cellules d'adénocarcinomes coliques humains (HT-29) (résultats non montrés).

L'expression de CRF2 est au niveau des cellules épithéliales est augmentée en condition de stress, dans un modèle de colites au DSS chez le rat et dans les cellules cancéreuses (résultats non montrés).

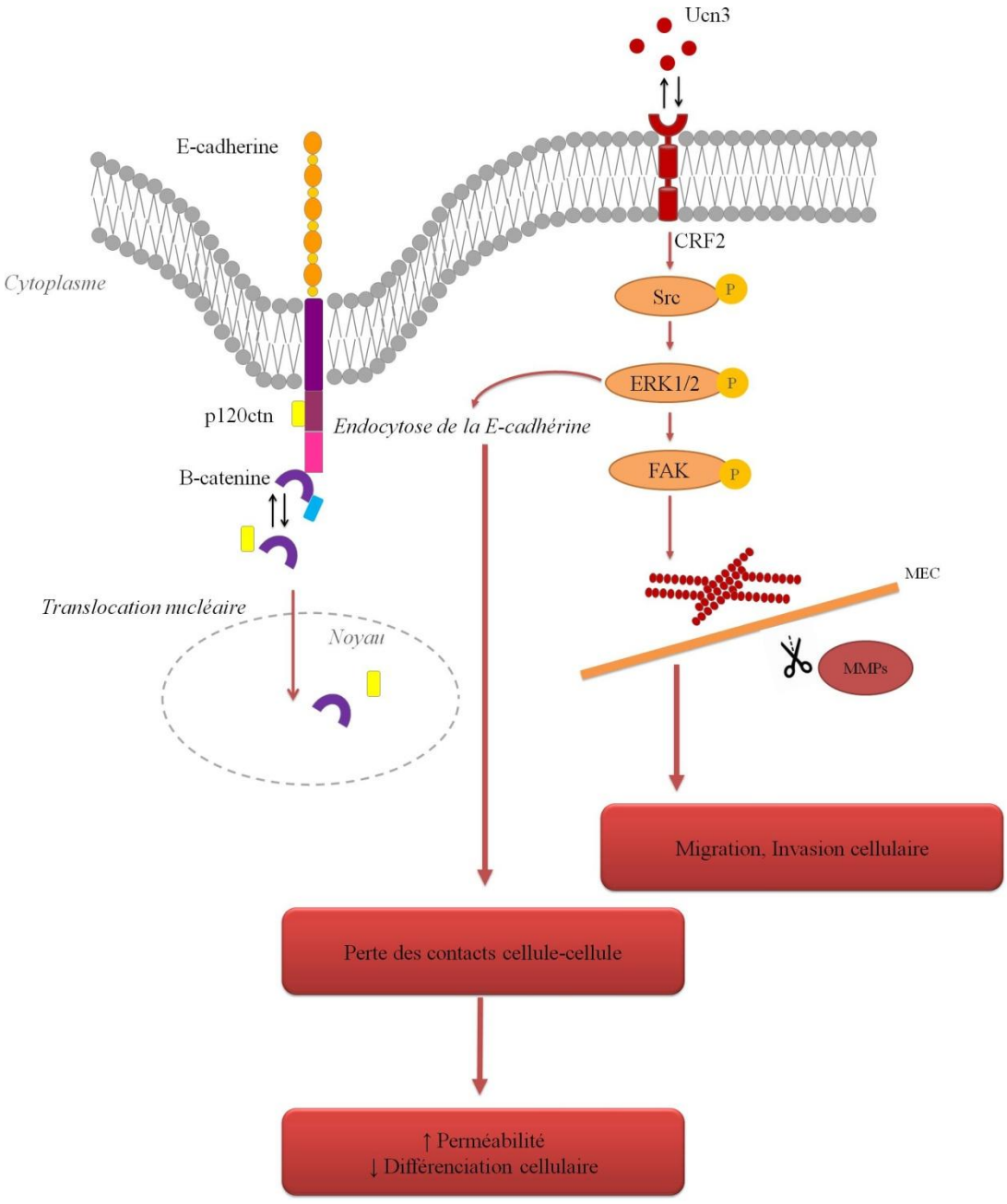


Figure 57 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral du CRF2.

L'activation du CRF2 par son ligand, l'Ucn3, provoque une perte des contacts intercellulaires qui amène à :

i) La perte des contacts intercellulaires favorise l'augmentation de la perméabilité para- et trans-cellulaire et donc l'inflammation ;
ii) Un retard de différenciation cellulaire;
iii) Une réorganisation des interactions cellules-MEC par la synthèse de MMPs favorisant la migration et l'invasion cellulaire et doc le développement tumoral.

Rôle Pro-inflammatoire du CRF2 altération de la perméabilité intestinale

Le stress provoque une perturbation de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale induisant une aggravation des troubles gastro-intestinaux tels que les MICI et le syndrome de l'intestin irritable (Chang et al., 2011). Le stress précoce (agressions, abus sexuels, changement de structure familiale) a une part non négligeable dans l'étiologie des MICI puisqu'il impacte à long terme la physiologie épithéliale en modifiant sa composition en terme de répartition des différents types de cellules et de leurs interactions (Heitkemper, Cain, Burr, Jun, & Jarrett, 2011; Walker, Gelfand, Gelfand, & Katon, 1995). Les épisodes de stress « aigus », quant à eux, peuvent initier ou aggraver les poussées inflammatoires chez les patients MICI et dans les modèles de colites chez les animaux (Collins, 2001; Mawdsley & Rampton, 2006; Melgar et al., 2008; Qiu et al., 1999).

Ainsi, l'expression des molécules impliquées dans la signalisation du système CRFergique est augmentée lors des poussées inflammatoires : l'expression de l'Ucn2 et du CRF2 a été identifiée au niveau des cellules du côlon des patients RCH et MC (Moss et al., 2007). L'expression des ligands est corrélée à l'intensité des poussées inflammatoires chez les patients RCH (Saruta et al., 2004).

Pour appréhender le rôle du système CRFergique dans la régulation de l'homéostasie intestinale, certaines approches ont été développées basées sur l'inhibition des ligands ou des récepteurs par leur extinction génétique ou pharmacologique. Ainsi, des injections locales de shRNA ciblant les récepteurs au CRF diminuent les colites induites par le TNBS. Ceci suggère que les deux récepteurs du système CRFergique (CRF1 et CRF2) participent aux processus inflammatoires (Chang et al., 2011). Le rôle pro-inflammatoire du CRF2 a également été démontré dans les cellules NCM460, l'activation du CRF2 par l'Ucn2 induit l'accumulation nucléaire de NFκB et la libération d'IL8 et de MCP-1 (Kokkotou et al., 2006; Moss et al., 2007). Dans ces cellules, l'Ucn2 induit aussi l'activation de MAPK qui participe aux processus de différenciation cellulaire, de survie et d'apoptose et peut ainsi modifier l'équilibre prolifération/différenciation/apoptose de l'axe crypto-villositaire.

Nos résultats permettent de mettre en évidence un nouveau rôle pro-inflammatoire du CRF2 exprimé par les cellules épithéliales intestinales. Celui-ci se traduit par une augmentation de la perméabilité intestinale. En effet une augmentation de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire avait été décrite suite à l'activation du CRF2 au niveau des mastocytes et/ ou du SNE (Kiliaan et al., 1998; Javier Santos et al., 2008; Teitelbaum, Gareau, Jury, Yang, & Perdue, 2008).

Chez les rats Wistar- Kyoto (sensibles au stress), les stress de contention (Kiliaan et al., 1998; J Santos et al., 1999a) ou d'évitement (J Santos et al., 1999b; Saunders et al., 2002) de l'eau induisent une stimulation du transit et la défécation. La perméabilité intestinale au niveau de l'intestin grêle et du côlon a été analysée en chambre d'Ussing : les deux types de stress conduisent à une hausse de sécrétion d'ions et une diminution de l'efficacité de la barrière épithéliale. Ces effets peuvent être mimés par l'injection intra-péritonéale de CRF (une heure avant l'analyse) et sont abrogés par l'utilisation d'antagoniste non-spécifique aux récepteurs du CRF, le CRF_{9-41}. Nos résultats montrent que l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par l'Ucn3 est due à l'activation du CRF2 puisqu'elle est abolie par un prétraitement à l'Astressin 2B, un antagoniste du CRF2.

L'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale est illustrée par la dissociation des jonctions intercellulaires. Nous avons observés que les protéines des JA (E-cadhérine et p120ctn) présentes dans les RL dès les phases précoces de la différenciation entérocytaire (Chartier et al., 2011) sont délocalisées de ces structures en réponse à l'Ucn3 ainsi que de la membrane plasmique. Ces modifications coïncident avec la diminution la TEER observée lors du traitement des cellules HT-29 différenciées par l'Ucn3 (1- 2h30) suggérant que la désorganisation des JA induite lors de l'activation du CRF2 soit à l'origine des perturbations de la perméabilité. L'effet sur les JA de l'Ucn3 semble transitoire sur la perméabilité intestinale puisqu'après cinq heures de traitement à l'Ucn3, on note une restauration de la TEER illustrée par relocalisation de la E-cadhérine et de p120ctn dans la membrane plasmique et plus particulièrement dans les RL. Or nous avons observé au laboratoire une diminution de l'expression globale de la E-cadhérine après 5 heures de traitement à l'Ucn3, on peut alors supposer qu'il y ait un enrichissement membranaire de la E-cadhérine permettant de rétablir les JA. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de la E-cadhérine et de p120ctn dans les fractions 5-6 et 7-8 pourrait illustrée des jonctions nouvellement formées dont l'état de maturation est intermédiaire entre les HT-29 J0 et J10 non traitées.

Une modification de la distribution des jonctions intercellulaires est également observée dans un modèle de rat TNBS où les jonctions serrées sont diminuées dans les RL (Li et al., 2008).

Récemment, il a été mis en évidence que l'activation des récepteurs au CRF induirait la phosphorylation de src. Src est un acteur dans la régulation des JA : cette kinase permet la

mise en place des JA par la phosphorylation de PI3K (Pang, Kraemer, Stehbens, Frame, & Yap, 2005). A contrario, si les JA sont déjà mise en place la phosphorylation de src conduit à la déstabilisation des JA (Anastasiadis et al., 2000) par la phosphorylation de p120ctn (Ireton et al., 2002) entrainant l'endocytose de la E-cadhérine qui serait alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Fujita et al., 2002). Cette hypothèse est en adéquation avec la perte de l'expression de la E-cadhérine et de p120ctn au niveau des RL et la diminution de l'expression générale de la E-cadhérine.

Régulation de la différenciation entérocytaire par le CRF2

La mise en place des jonctions intercellulaires (en particulier des JA) est corrélée avec le processus de différenciation cellulaire (Gout et al., 2004; Peignon et al., 2006; Schreider, Peignon, Thenet, Chambaz, & Pinçon-Raymond, 2002). Etant donné que l'activation du CRF2 par l'Ucn3 induit une altération de ces systèmes d'adhérence, nous avons testé l'effet de stress aigus sur la différenciation des cellules Caco-2. Des effets sur la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin avaient été décrits suite à l'administration chronique de CRF chez le rat. Dans ces conditions on observe une augmentation du nombre de cellules entérochromaffines, tandis que l'administration d'Ucn2 diminue le nombre de cellules de Paneth et de Goblet (Estienne et al., 2010). L'effet généré sur les cellules de Paneth et de Goblet ne dépasse pas la durée du renouvellement de la population cellulaire de l'épithélium contrairement aux cellules entéroendocrines. Ces éléments suggèrent que pour induire un effet à long terme, le CRF1 affecte nécessairement les cellules souches.

L'altération générée par un stress aigu ne dépasse pas 5 jours soit le temps du renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal. Cependant le stress aigu provoqué par des stimuli acoustiques conduit à l'augmentation de la perméabilité du côlon due à la dégranulation des mastocytes et à la sur-production d'INFγ (Castagliuolo et al., 1996; Lakshmanan et al., 2008; Santos et al., 1999; Santos et al., 2008). Dans ces expériences, la barrière épithéliale colique est morphologiquement altérée, l'expression des ARNm codants pour les protéines des jonctions serrées est réduite et la différenciation des côlonocytes est modifiée (Demaude et al., 2006). Nous avons également observé des modifications de la barrière épithéliale lors d'un stress aigu à l'Ucn3 avec une augmentation des perméabilités para- et trans- cellulaires (5 heures, 100 nM).

Le stress chronique (5-15 jours) est plus révélateur des conditions anxiogènes répétées subies par l'homme au quotidien. Il a des conséquences plus dramatiques sur la structure de l'épithélium intestinal. Chez le rat, la chronicité du stress conduit à la réduction des longueurs des cryptes (par l'augmentation de l'apoptose) et à l'augmentation de la prolifération cellulaire pour tenter de remplacer les cellules endommagées ainsi qu'à la diminution de la différenciation cellulaire. La présence de cellules non-différenciées au sein de l'épithélium peut être responsable du défaut de perméabilité de la barrière épithéliale (Boudry, Jury, Yang, & Perdue, 2007). Nous avons montré dans les cellules Caco-2 différenciées que l'utilisation chronique de l'Ucn3 conduit à la perte de différenciation entérocytaire. Cela se traduit par une diminution d'expression du facteur de transcription KLF4 ainsi que des enzymes qu'ils régulent. De façon surprenante, de tels effets sont observés lors d'un stress aigu que sur des cellules Caco-2 à 21 jours de différenciation. Ces résultats suggèrent que l'Ucn3 pourrait induire une dédifférenciation cellulaire.

KLF4 est un facteur de transcription à doigt de zinc qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la différenciation cellulaire au cours du développement et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium de l'intestin. En effet, les cibles transcriptionnelles de KLF4 sont impliquées dans la différenciation cellulaire comme Lama1, codant pour la laminine 1, et le gène codant pour la phosphatase alcaline (Hinnebusch et al., 2004; Piccinni et al., 2004).
D'après des expériences *in situ* et des expériences d'immunohistochimie, KLF4 est exprimé dans l'intestin grêle et dans le côlon (Shields, Christy, & Yang, 1996) et de façon prédominante dans les cellules épithéliales différenciées du haut des cryptes et des villosités. KLF4 présente un profil d'expression similaire à APC, un régulateur négatif de la voie Wnt (Smith et al., 1993). Dans les cellules HT-29, l'expression de KLF4 est induite par l'activation d'APC. Les souris KO conditionnel pour KLF4 présentent une altération de l'homéostasie de l'épithélium puisque KLF4 inhibe la prolifération cellulaire en activant divers gènes qui codent pour des régulateurs négatifs du cycle cellulaire et inhibe l'expression de gènes favorisant la progression du cycle cellulaire (Chen, Whitney, Gao, & Yang, 2003). L'Ucn3 induit une diminution de l'expression de KLF4 qui pourrait induire une augmentation de la prolifération cellulaire et une altération du lignage cellulaire sécrétoire. En effet, les souris $Klf4^{-/-}$ présentent une déplétion de 90 % des cellules à mucus (Katz et al., 2002) qui serait du à une absence de maturation des cellules de Goblet. Ce phénotype est minimal dans l'intestin grêle et surtout observé dans le côlon où KLF4 est plus exprimé.

KLF4 joue un rôle critique dans la régulation de la différenciation et dans le contrôle du cycle cellulaire, KLF4 a également été identifié comme un gène suppresseur de tumeur incluant le cancer colorectal, de l'estomac et de l'œsophage (Choi et al., 2006; Dang et al., 2000; Dang, Mahatan, Dang, Agboola, & Yang, 2001; Kanai et al., 2006; Wang et al., 2002; Wei, Kanai, Huang, & Xie, 2006). La surexpression de KLF4 dans la lignée cellulaire de cancer du côlon RKO, réduit la migration et l'invasion cellulaire. *In vivo* le KO conditionnel de KLF4 induit une augmentation de la prolifération et une altération de la différenciation cellulaire (Katz et al., 2005). Cependant, le rôle de KLF4 dans les cellules intestinales différenciées et dans les cellules du cancer du côlon, ainsi que le mécanisme par lequel il régule l'homéostasie intestinale restent méconnus.

La diminution de l'expression de KLF4 suite l'activation de CRF2 pourrait donc induire :

i) une augmentation de la prolifération ;

ii) une altération de la différenciation épithéliale intestinale ;

iii) une perte de cellules à mucus provoquant une forte diminution de mucus et conduisant ainsi à des altérations mécaniques (par le chyme) et chimiques (par les sucs digestifs) de l'épithélium ;

iv) une altération de la libération de défensives favorisant la prolifération bactérienne ;

v) une transition épithélio-mésenchymateuse à l'origine du développement tumoral.

Le CRF2 pourrait donc avoir un rôle dans la progression tumorale par la perte des contacts cellulaire, l'augmentation de la perméabilité cellulaire et la diminution de KLF4.

Rôle Pro-tumoral du CRF2 (Cf article 1)

Nous avons observé que l'Ucn2/3 et le CRF2 est augmenté dans les cancers colorectaux peu différenciés et de haut grade suggérant un rôle du CRF2 dans la progression tumorale. Nous avons alors utilisés deux lignées cellulaires (HT-29 et SW620) qui diffèrent par leur habilité à former des contacts intercellulaires. L'altération des jonctions intercellulaires conduisant à l'endocytose de la E-cadhérine est induite par l'activation de la voie src/ERK et la translocation des caténines (p120ctn et β-ctn) dans le noyau. Cette voie de signalisation entraîne également une réorganisation des complexes d'adhérence cellule-MEC par i) la phosphorylation de FAK, ii) la modification du cytosquelette d'actine et des complexes d'adhérence focale. Ainsi, le CRF2 peut promouvoir le potentiel métastasique des cellules de cancer colorectal.

Axe II

Etude du rôle du système CRFergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Présentation du travail

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI)

Les MICI se composent de la maladie de Crohn (MC) et de la rectocolite hémorragique (RCH).En Europe, le nombre de patients atteints de MICI est estimé à 850 000 pour la RCH dont 60 000 en France, et 1 000 000 pour la MC dont 40 000 en France. Les MICI touchent plus volontiers les sujets jeunes, entre 20 et 30 ans pour la MC, 30 à 40 ans pour la RCH, mais l'on note également un pic d'incidence également entre 50 et 60 ans. On observe également que la MC prédomine chez les femmes.

Les MICI se manifestent par des poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémission. Le déclenchement, la durée et la sévérité des crises peuvent varier suivant les patients et au cours de la pathologie. Les symptômes les plus souvent associés aux MICI sont des douleurs abdominales, des diarrhées, un amaigrissement et un ralentissement de l'état général (fatigue excessive, fièvre). Dans 20% des cas, les patients développent également des manifestations inflammatoires extra-digestives telles que des atteintes articulaires (polyarthrite), dermatologiques (ulcération, érythème noueux) et oculaires (conjonctivite) (Larsen, Bendtzen, & Nielsen, 2010).

La MC et la RCH ne présentent pas les même atteints physiologiques. En effet, la MC est caractérisée par une inflammation touchant l'ensemble de tube digestif (de la bouche à l'anus) avec des manifestations généralisées ou ciblées. Ces lésions sont dites transmurales puisqu'elles atteignent les différentes couches de la paroi digestive et peuvent être responsable de perforations, de fistules et d'abcès. A l'inverse, la RCH provoque des lésions superficielles localisées au niveau du côlon et du rectum. Ces lésions ne touchant que la muqueuse et la sous-muqueuse sont à l'origine d'hémorragie caractéristique de cette pathologie. De plus, on note une altération de la barrière épithéliale intestinale par une diminution de la sécrétion de mucus et de défensines et/ou une augmentation de la perméabilité trans-cellulaire ou para-cellulaire. Ce phénomène conduit à l'activation des cellules immunitaires de la *lamina propria*. Parallèlement à la dissociation des cellules épithéliales, on note une diminution de la tolérance immunitaire face aux molécules du soi (bactéries commensales) qui induit également une réponse immunitaire démesurée et non régulée (Fiocchi, 1998; Sartor, 2006).

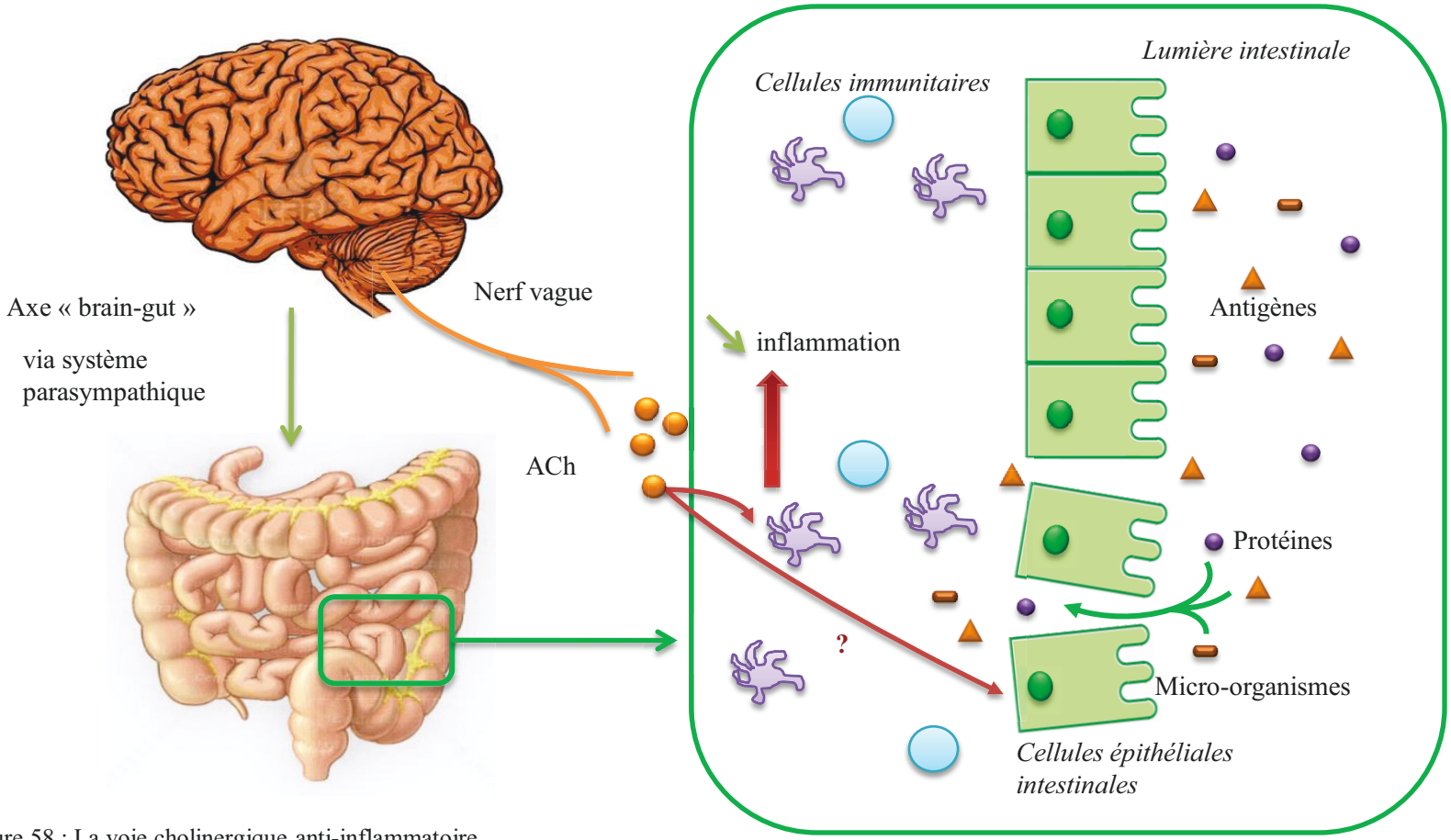


Figure 58 : La voie cholinergique anti-inflammatoire.

La voie cholinergique anti-inflammatoire a été découverte dans les années 2000, elle est activée en réponse à une inflammation. Les afférences vagales transmettent le signal de l'inflammation au niveau du noyau du tractus solitaire, dans le système nerveux central. Des potentiels d'action sont alors transmis par les efférences vagales au niveau de la périphérie. Cela induit une sécrétion d'ACh qui va interagir avec les cellules immunitaires dont les macrophages dans les organes lymphoïdes ou sur le site de l'inflammation. En effet, les macrophages portent des récepteurs α7 nicotinique (α7 nAChR), récepteurs spécifiques de l'ACh. L'activation de ces récepteurs conduit à l'inhibition du facteur de transcription NFκB responsable de la transcription de cytokines pro-inflammatoire (TNF-α, IL-1, IL-6). Cette action permet de diminuer l'environnement cytokinique et donc d'obtenir un effet anti-inflammatoire (Pavlov & Tracey, 2005).
L'effet anti-inflammatoire des récepteurs nicotiniques a été étudié *via* les cellules immunitaires sans considérer la composante épithéliale. L'originalité de notre travail est d'avoir concentré nos recherches sur les récepteurs cholinergiques portées par les cellules épithéliales. L'activation de ces récepteurs aurait-elle un effet anti-inflammatoire ?
D'après *Tracey et al; Nature 2005*

Il y a actuellement 4 familles de substances pharmacologiques couramment utilisées dans le traitement des MICI: les salicylés, les corticoïdes, les immunosuppresseurs et les thérapies biologiques. Ces traitements ont des effets suspensifs, mais n'ont pas d'effets curatifs. Par ailleurs, la prévalence d'une mauvaise observance est de 30-40%. Cela s'explique par plusieurs raisons : tout d'abord par la coexistence de désordres psychopathologiques, mais aussi par de l'anxiété et de la dépression, ou encore par l'insuffisance qualitative de la relation médecin-malade et enfin par les nombreux effets secondaires des thérapies conventionnelles. Par conséquent on peut dire qu'une mauvaise observance conduit à un risque de rechute et de cancer colorectal plus élevé (Tahri, 2007).

De nouveaux traitements sont expérimentés afin d'augmenter l'observance et de minimiser les effets secondaires : l'une de ces thérapies potentielles est la voie cholinergique anti-inflammatoire.

La voie cholinergique anti-inflammatoire

Cette voie cholinergique anti-inflammatoire a été découverte dans les années 2000, Elle est activée en réponse à une inflammation. Les afférences vagales transmettent le signal de l'inflammation au niveau du noyau du tractus solitaire, dans le système nerveux central. Des potentiels d'action sont alors transmis par les efférences vagales au niveau de la périphérie. Cela induit une sécrétion d'ACh qui va interagir avec les cellules immunitaires dont les macrophages dans les organes lymphoïdes ou sur le site de l'inflammation. En effet, les macrophages portent des récepteurs α7 nicotinique (α7 nAChR), récepteurs spécifiques de l'ACh. L'activation de ces récepteurs conduit à l'inhibition du facteur de transcription NFκB responsable de la transcription de cytokines pro-inflammatoire (TNF-α, IL-1, IL-6). Cette action permet de diminuer l'environnement cytokinique et donc d'obtenir un effet anti-inflammatoire (Pavlov & Tracey, 2005).

L'effet anti-inflammatoire des récepteurs nicotiniques a été étudié *via* les cellules immunitaires sans considérer la composante épithéliale (figure 58). L'originalité de notre travail est d'avoir concentré nos recherches sur les récepteurs cholinergiques portées par les cellules épithéliales. L'activation de ces récepteurs aurait-elle un effet anti-inflammatoire ?

Les récepteurs cholinergiques (AChR) sont divisés en deux catégories : les récepteurs muscariniques (mAChR) et les récepteurs nicotiniques (nAChR). Les mAChR sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G. Tandis que les nAChR sont des récepteurs ionotropiques. Pour activer ces récepteurs, nous avons utilisé deux ligands :

- un ligand endogène : l'ACh qui stimule les récepteurs cholinergiques avec une plus grande affinité pour les mAChRs. Il peut être libéré par les terminaisons nerveuses du système somatique et parasympathique ou de manière autocrine par des cellules non-neuronales.
- Un ligand exogène : la nicotine qui stimule les nAChRs.

Pour étudier la signalisation sous-jacente à l'activation des récepteurs cholinergiques, nous avons utilisé deux lignées cellulaires : HT-29 et Caco-2/TC7.

Notre projet consiste à déterminer :

1) Si le système cholinergique est exprimé au niveau des cellules épithéliales.

2) Par quel(s) mécanisme(s) le système cholinergique agit sur l'homéostasie intestinale :

- Rôle des nAChRs
- Rôle des mAChRs

Nous focaliserons notre étude sur la caractérisation des mécanismes moléculaires de l'effet anti-inflammatoire de la voie cholinergique au niveau des cellules épithéliales.

3) De caractériser l'interaction entre le système CRFergique périphérique et les mAChRs au niveau des cellules épithéliales.

Journal of Cancer Therapy, 2013, 4, 1116-1131
doi:10.4236/jct.2013.46128 Published Online August 2013 (http://www.scirp.org/journal/jct)

Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer: Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation?

Marjolaine Pelissier-Rota[1,2], Michèle Lainé[1,2], Benjamin Ducarouge[1,2], Bruno Bonaz[1,2,3], Muriel Jacquier-Sarlin[1,2*]

[1]Centre de Recherche Inserm U836, Institute of Neurosciences, Grenoble, France; [2]University of Grenoble, Grenoble, France; [3]Hospitalo-Universitary Center, CHU of Grenoble, Grenoble, France.
Email: [*]jacquier-sarlin@ujf-grenoble.frt

Received May 28th, 2013; revised June 30th, 2013; accepted July 8th, 2013

Copyright © 2013 Marjolaine Pelissier-Rota *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) patients, such as Crohn's disease or ulcerative colitis suffer from chronic and relapsing intestinal inflammation that favours the development of colitis associated cancer (CAC). This inflammation is initiated by aberrant activations of the innate immune responses associated to intestinal barrier defects. The conventional medical therapies consist to decrease the inflammatory response, which also decrease the risk of colon carcinoma but lead to severe side-effects. Recently, a number of animal studies have demonstrated that innate immune responses are attenuated by stimulation of the efferent arm of vagus nerve (VN) through its neurotransmitter acetylcholine (ACh), that acts on resident macrophages α7 nicotinic receptor (α7 nAChR). ACh also acts as a signalling molecule in epithetlial cells through cholinergic receptors such as nAChR or muscarinic (mAChR) receptors. In the current study, we aimed to extend these findings to CAC prevention by treating human adenocarcinoma cell lines through targeting cholinergic receptors with nicotine (which binds nAChR) and ACh (which binds both cholinergic receptors). Using HT-29 and Caco-2 cell lines, we demonstrated that ACh-induced activation of mAChR results in cell dissociation together with changes in expression and localization of intestinal tight and adherens junction proteins. ACh-induced modulation of cell adhesion proprieties correlates with the acquisition of invasive potential. By contrast, nicotine-mediated activation of nAChR maintains epithelial cell organisation. ACh-released by VN stimulation (VNS) could effectively preserve epithelium integrity thus limiting inflammatory response and tumor development. However, attention should be paid on the nature of the cholinergic receptor solicited. Indeed, regarding to the protective effects of nAChR signalling on epithelial cells, activation of mAChR would worsen the disease and led to increase inflammation. These data have important repercussions on the therapeutic potential of VNS in IBD and CAC, which may represent "the yin and yang" of the intestinal homeostasis.

Keywords: Cell Adhesion; Colorectal Cancer; Tumor Progression; Cholinergic Receptors; Inflammation; Vagus Nerve

1. Introduction

Inflammatory Bowel Diseases (IBD), such as Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC), are multifactorial chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract for which the exact causative mechanism is still unclear. According to a current hypothesis, an increased intestinal permeability due to an epithelial barrier defect, coupled with a dysfunctional immune response participate to the development of chronic intestinal inflammation [1].

In the long-term, IBD can induce further complication and patients have an increased risk developing other pathologies such as colorectal cancer (CRC). About 20% of CRC cases can be genetically attributed to a family history. Involvement and mechanisms by which environmental factors contribute to the disease are still unclear. Colitis associated cancer (CAC) is a type of colon cancer which is preceded by clinically detectable IBD. CAC develops from dysplasia, which is stimulated by chronic inflammation, rather than polyps. Even though CRC does not always develop after IBD, its high frequency in patients with IBD represents a paradigm for the connection

[*]Corresponding author.

between inflammation and cancer in terms of epidemicology and mechanistic studies in preclinical models (for review [2]). UC increases cumulative risk of CRC by up to 18% - 20%, while CD by up to 8% after 30 years of active disease. The increase in prevalence of CAC in IBD patients seems to correlate with the chronic inflamematory conditions of the intestinal mucosa, in particular with the degree [3], duration [4,5] and anatomical extent of colonic inflammation [6], as well as the presence of primary sclerosing cholangitis, and IBD management such as efficacy of anti-inflammatory therapies [7]. In animal models, intraperitoneal injection of the carcinogen azoxymethane (AOM) followed by repeated cycles of dextran sulfate sodium (DSS) or mice lacking the gene for the IL-10 cytokine, chronic inflammation also results in an increased frequency of intestinal tumors [8,9]. Epidemiological studies report that the long-term administration of anti-inflammatory drugs decreases the risk of colon carcinoma [10]. The conventional medical therapy for IBD consists to reduce the inflammatory response using 5-aminosalicylates, corticosteroids, immunosuppressives (azathioprine/mercaptopurine), and biological therapies (anti-TNFα), but these treatments have severe side-effects [11,12].

Vagus nerve (VN) is the main nerve of the parasympathic division of the autonomic nervous system for the thoracic and abdomino-pelvic viscera that controls heart rate, hormone secretion and gastrointestinal motility/secretion [13]. Recent studies indicate that VN is also an immunomodulator [14]. In experimental models of inflammatory disease, vagus nerve stimulation (VNS) attenuates the production of pro-inflammatory cytokines and inhibits the inflammatory process [15,16]. The inflammatory reflex is a centrally neuro-endocrine-immune integrated physiological mechanism that maintains homeostasis through: 1) the activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by VN afferent fibers and 2) the cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP) by VN efferent fibers [17,18]. At the molecular level, the CAP relies on the effects of acethylcholine (ACh), the VN principal neurotransmitter, on macrophages [18]. ACh signals through either muscarinic (G-protein-coupled) receptors (mAChR) or nicotinic (ligand-gated ion channels receptors (nAChR) [19]. There are five subtypes of mAChR (M1-M3) which are products of distinct genes [20]. They present similar structure constituted of seven transmembrane helice (TM1-TM7) and three extracellular and three intracellular loops [21]. nAChRs are transmembrane proteins composed of five subunits arranged around an axis perpendicular to the membrane. Therefore, nAChR is a homo-(α7 or α9) or a hetero-pentamer composed from various subunits (α2 - α10; β2 - β4, δ, ε, γ). These cholinergic receptors are present in the central and peripheral nervous systems, in immunocompetent cells (monocyte, lymphocyte, and macrophage). Activation of α7 nAChR, either directly through interaction with selective nicotinic agonist (such as nicotine) or indirectly through the activation of the autonomic nervous systems (e.g. VN), inhibits adaptive and innate immune responses [22-24]. The affinity of nicotine for this receptor is greater than its physiological agonist, ACh [25]. nAChR signaling also reduces macrophage cytokine production and inflammation in animal models of pancreatitis [26], DSS-induced colitis [27], 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis [28] and intestinal ileus [29]. Thus, VNS appears as an alternative therapy to conventional treatment, for digestive disorders such as IBD. Currently, VNS is used in treatment of patient with seizure disorders and depression through the stimulation of VN afferent fibers [30] or metabolism disorders such as obesity (for review [31]).

Inflammation could contribute to carcinogenesis by increasing the level of reactive oxygen species that have a mutagenic effect on DNA (tumor initiation) [32] or by generating an environment in favour of sustained growth, angiogenesis, migration and invasion of tumor cells (tumor progression and metastasis). Various components of the inflammatory environment in IBD are key elements in the different steps of cancer [33]. Recent works have elucidated the role of various immune cells and mediators in all the steps of colon carcinogenesis with the dissection of some molecular pathways [2,34,35]. In this paper, we will focus on the therapeutic potential of VNS in CAC, not only by regulating inflammatory response at the immune level but also by preventing or limiting intestinal barrier breakdown associated to the inflammation process. Indeed, epithelial cells also express cholinergic receptors [36]. While the role of α7 nAChR in intestinal cells is less understood, cholinergic receptors regulate ion transport across cell membrane and thereby affect intestinal water movement [37]. The main subtype of mAChR in rat and human intestinal epithelial cells is the M3 and to a lesser extends the M1 receptor [38-40].

Epithelia form a barrier constituted of specialized cells characterized by structural features including polarized morphology and cell-cell contacts. They lie on a basement membrane, which is organized into a complex structure containing collagen type IV (COIV), various laminin isoforms, and proteoglycans [41-43]. Interactions between cells and this specialized extracellular matrix (ECM) are crucial for essential biological processes such as migration, proliferation, differentiation, and cell survival. The cell-cell or cell-ECM interactions are mediated through various transmembrane receptors, which are linked intracellularly to cytoskeleton components and signal transduction molecules [44,45]. Tight junctions (TJ) are composed of transmembrane proteins (claudins, occludins and junctional adhesion molecules), scaffold proteins like zona occludens (ZOs) that link the actin cytoskeleton, and intracellular regulatory molecules in-

Copyright © 2013 SciRes.

cluding kinases [46]. Directly beneath TJ are the adherens junctions (AJ) with E-cadherin connected to the actin cytoskeleton via α/β catenins and regulated by p120ctn [47]. Disorganization of these cellular junctions could participate in the infection process but also in the cellular dedifferentiation preceding carcinogenesis and cell migration [48]. These epithelial alterations are more pronounced in UC tissues in which the development of malignancies is apparently more frequent than in CD tissues, suggesting that disturbances of junction-associated molecules are likely to be involved in carcinogenesis from IBD patients. Using HT-29 and Caco-2 cells, two human colonic adenocarcimoma cell lines, we demonstrated that VNS could preserve epithelium integrity thus limiting inflammatory response and tumor development. However, attention should be paid on the nature of the cholinergic receptor solicited. Indeed, regarding to the protective effects of nicotine-induced activation of nAChR on epithelial cells, mAChR activation by ACh favours the acquisition of invasive potential with a modulation of cell adhesion proprieties. These data have important repercussions on the therapeutic potential of VNS in IBD and CAC.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and Caco-2/TC7 were cultured at 37˚C in a 5% CO_2 atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, 5% penicillin and streptomycin. The medium was changed every day to avoid glucose exhaustion, which leads to differentiation. The differentiation of HT-29 cells was initiated by replacing standard medium by glucose free DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% dialyzed foetal calf serum, 5 mM galactose, 15 mM HEPES, selenous acid (10^{-2} µg/ml), penicillin, and streptomycin [49]. This medium (Gal-medium or differentiating medium) was changed every day. The differentiation of Caco-2 occurs after 15 days of culture postconfluence. The cells were harvested in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1 mM EDTA and 0.05% trypsin (w/v).

2.2. Chemical Reagents and Antibodies

Polyclonal antibodies directed against M3 mAChR (Cat. N˚. AB41169) provided from Abcam (12964, Abcam, Paris, France). Anti-human E-cadherin (Clone HECD1) monoclonal antibody was obtained from Takara Biochemicals (Cambrex Bio Science, Paris, France). Monoclonal antibody against p120ctn (clone 98) was purchased from BD Biosciences/Transduction Laboratories (Pont de Claix, France). Anti-actin (Cat. N˚. A2066), and anti-β catenin (Cat. N˚. C2206) polyclonal antibodies and α7 nAChR (clone 306) monoclonal antibody were obtained from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Polyclonal antibody directed against Src-P^{Tyr418} (AT-7135) was purchased from MBL Calbiochem (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), monoclonal anti-Src (Clone GD11) was from Millipore (Molsheim, France). Occludine clone (OC-3F10) and ZO-1(clone ZO1-1412) monoclonal antibodies were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Alexa-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Horse Radish Peroxydase-conjugated goat anti-mouse was from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit antibodies were from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France).

2.3. RT-PCR

Total RNA extractions were performed using Trizol™ reagent and 1 µg of total RNA was denaturized and subsequently processed for reverse transcription using M-MLV (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and run on thermocycler (Eppendorf). Primer sequences and probes are:

7 nAChR	5'CAGGGGTGAAGACTGTTCGT
	3'CACTGTGAAGGTGACATCCG
M3AChR	5'CCTTCAAGGAAGCCACTCTG
	3'GTCTGTGGGTTGATGTGTGC
GAPDH	5'GAACATCATCCCTGGCTCTACTGG
	3'AATGCCAGCCCCAGCGTCTACTGG

PCR conditions are: 5 min at 92˚C followed by 35 cycles (40 sec at 92˚C, 40 sec at 60˚C and 1 min at 72˚C) and 10 min at 72˚C. PCR were analyzed on 1.5% agarose gel. Quantification was performed using Image J (NIH software). GAPDH were used as housekeeping gene.

2.4. Immunoblot

Cells were grown to confluence and lysed with a buffer made of 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and supplemented with 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µM pepstatin, 2 mM $CaCl_2$ and $MgCl_2$, for 15 min on ice. Protein concentrations in lysates were determined using the copper reduction/bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce Chemical Co) according to the manufacturer's instructions. Proteins (30 µg in SDS-β mercaptoethanol sample buffer) were resolved on 10% polyacrylamide gels, transferred into PVDF membranes (Hybond-C super; Amersham), and blocked in 5% bovine serum albumin in 0.1% Tween 20 in TBS for 1 hr at room tempera-

Copyright © 2013 SciRes.

ture. After overnight incubation at 4˚C with primary antibodies diluted in the blocking solution, blots were washed in TBS, 0.1% Tween 20 and then incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (dilution of 1:10000) for 1 hr at room temperature before extensive washes. The blots were revealed by chemiluminescence (Amersham ECL reagents) and quantified with Image J software from NIH. Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-human α7 nAChR and M3 mAChR, E-cadherin, p120ctn and β-catenin (1:1000), ZO-1 (1:2000), and anti-actin (1:2000).

2.5. Immunofluorescent Staining

Cells were grown on glass coverslips and were treated as described previously [50]. After fixation with PFA-4% sucrose, non-specific sites were blocked for 1 hr at 37˚C with 3% BSA-0.5% Tween20. Then cells were incubated for 1 hr at 37˚C with specific antibodies which were diluted in the blocking solution at 1:100 for primary and 1:500 for secondary antibodies. Fluorescence photomicrographs were taken with a confocal microscope at the x100 objective (Leica TCS SPE) or an epifluorescence microscope at the x100 objective (ZEISS, Avio Vert 200 M).

2.6. Extracellular Matrix Preparation and Cell Adhesion

Tissue culture dishes were coated with LM-332 using the following methods: A431 epidermoid cells were cultured to confluence on various surfaces at 37˚C to allow for the deposit of LM-332, then cells were removed as previously described [51,52]. Briefly, confluent monolayers were sequentially extracted with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS, followed by 2M urea in 1M NaCl. All extraction buffers contained protease inhibitors (1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride and 2 mM N-ethylmaleimide). Plates were washed in PBS, incubated with 1%BSA, and stored at −20˚C. Human collagen type IV from placenta was obtained from Sigma Aldrich. Coating of plastic Petri dishes (Microtiter plates 96-well, Nunclone; Nunc, Roskilde, Denmark) was performed by overnight incubation with extracellular matrix proteins (10 μg/mL) at 4˚C. Plates were saturated with 3% (w/v) BSA in PBS for 2 hrs at 37˚C to block nonspecific adhesion. HT-29 cells were harvested and pre-treated or not with 100 nM nicotine or ACh for 30 min before to be plated (5×10^4 cells/well) in triplicate in coated 96-well microtiter plates and incubated from 0 to 60 min at 37˚C. Non adherent cells were removed by washing three times with PBS, and cell adhesion was estimated by a colorimetric cell proliferation assay (CellTiter 96 AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega).

2.7. Cell Invasion Assay

Total HT-29 cells (2.5×10^{-5}/mL) were placed in the top compartment of a 24-multiwell insert plate (BD Falcon), which was separated from the bottom compartment by BD-Matrigel Matrix membrane, with 0.4-μm pore size. Serum-free RPMI with or without nicotine or ACh (100 nM) were added into the top compartment and 10% FCS into the bottom compartment. After 48 hrs at 37˚C in a 5% CO_2 atmosphere, cells that had invaded through the Matrigel were analyzed: cotton swabs were used to remove cells on the upper surface of inserts. After fixation with PFA 4%, migratory cells were stained with Hematoxylin Gill's formula (Vector Laboratories) and manually counted under the microscope. The mean values of the readings and their SEM were calculated, and statistical differences were analyzed using Student's t-test for non-paired samples.

2.8. Assay for Cell Proliferation

Cell were plated in 96-well plates (2000 cells/well) at day 0 and cultured in complete DMEM medium without or with nicotine and ACh (100 nM). Cell proliferation was evaluated from day 1 to 3 using the CellTiter 96 Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Densitometric Analysis and Statistics

Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. All graphs represent the mean value ± SD of protein expression levels measured by densitometric analysis in "Image J" software (NIH). Statistics were performed with unpaired t-test and statistical significance was given by the number of asterisks ($^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$).

3. Results

3.1. Expression and Regulation of Cholinergic Receptors Expression in Human Colon Cancer Cell Lines

It has been described that human colon cancer cell lines expressed mainly M3AChR and α4, α5, α7 and β1 nAChR subunits but only α7 subunits form a functional receptor [53]. First, we analyzed whether α7 nAChR and M3AChR, the two major cholinergic receptors susceptible to be activated by ACh released by VNS are present tors was visualized by staining HT-29 cells and then imaging under confocal microscopy (**Figure 1(a)**). Without treatment, immunofluorescence staining demonstrated that these receptors produced varying intensities of labelling in the cells, seemingly localized at the membrane. Some cytoplasmic dots are observed probably matching with cholinergic receptor neosynthesis or endocytosis. There is also an accumulation of vesicles enriched in α7

Copyright © 2013 SciRes.

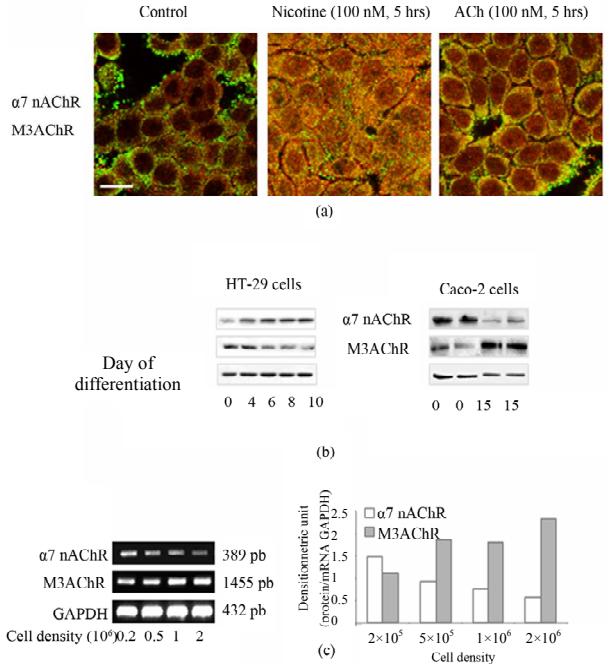


Figure 1. Functional cholinergic receptors: expression, distribution and regulation. (a) Expression and distribution of functional cholinergic receptors in HT-29 cells. Confocal immunofluoresence analysis of *α*7 nAChR (green) and M3AChR (red) in HT-29 cells incubated (or not) with nicotine or ACh (100 nM, 5 hrs). Co-localization is illustrated by yellow staining. Scale bar, 20 µm. (b) Cholinergic recaptor expression during cell differentiation. HT-29 cells are differentiated during 10 days by glucose starvation. Caco-2 cells are differentiated during 15 days after these cells formed a monolayer. Expressions of *α*7 nAChR and M3AChR in HT-29 cells and Caco-2 TC7 cell lines are quantified from immunoblot. Actin is used as loading control. C: Influence of cell density on cholinergic receptor expression. HT-29 cells are seeded at different concentration. Expression of cholinergic receptors are analysed by RT-PCR with specific primers. GAPDH are used as keeping house gene.

nAChR at the extern edge of cells not engaged in cell-cell contacts. In presence of cholinergic ligands (nicotine or ACh, 100 nM, 5 hrs) we observed cell dissociation (black spaces appeared between adjacent cells) associated with a modification of the cell shape (more spreading cells) in presence of ACh. Cholinergic treatment induces a hypercholinergic response (desensitization process) which is illustrated by a decrease of cholinergic receptor density at the membrane of epithelial cells with a concomitant increase of cytoplasmic labelling which indicate that they receptors are functional. Then their expression was analyzed at the protein level and according to the status of differentiation of epithelial cell lines (**Figure 1(b)**). For this purpose we chose two adenocarcinomas cell lines (HT-29 and Caco-2) able to differentiate *in vitro* under specific culture conditions. The differentiated state of HT-29 cells is obtained by substitution of glucose for galactose (Gal medium) in culture medium [54]. A variety of changes in the adhesive properties of HT-29 cells is observed during the first ten days of culture in the Gal medium which corresponds to the initial step of their differentiation [55,56]. Enterocyte differentiation of Caco-2 cells occurs after they reached confluence. They must be grown in confluent monolayer at least for 15 days [57]. Western blot also confirmed the presence of *α*7 nAChR and M3AChR in both cell lines. According to the differentiation status of cells, it appeared that *α*7 nAChR increases during the differentiation of HT-29 cells and stays constant in Caco-2 cells. In contrast M3AChR expression decreases in HT-29 cells while it increases in Caco-2 cells. AChR expression according to the cell density was analyzed by RT-PCR (**Figure 1(c)**. *α*7nAChR are present at low cell density and their expression decreases at higher cell concentration. In contrast the expression of M3AChR slightly increases with the cell density. These observations could explain the discrepancy noticed during the differentiation of the two cell lines. Indeed during the differentiation process, the substitution of glucose by galactose leads to cell death and thus lost of HT-29 cells. In contrast Caco-2 cells are still confluent.

3.2. Only mAChR Induces a Loss and Redistribution of TJ and AJ Proteins

Disruption of epithelial barrier integrity is identified as one of the pathologic mechanisms in IBD and cancer development. Adequate intestinal TJ protein function determines intestinal barrier integrity. We measured changes in expression and localization of occluding and ZO-1 to determine whether modulation of these TJ proteins correlates with changes observed with cholinergic treatment [58,59]. For this purpose, we use differentiated Caco-2 cells which established "mature" TJ compared to HT-29 cells. Confluent monolayers of Caco-2 cells differentiated for 15 days were harvested and immunoblotted (**Figure 2(a)**). Western blots indicated that while nicotine didn't modify the expression of ZO-1 and occludin, ACh induces a time dependent loss of expression of these two TJ proteins. Fluorescence microscopy analysis confirmed the changes observed in western blots (**Figure 2(b)**). Membrane polarity was estimated by the actin cytoskeletal organization in microvilli at the apical side and actomyosin ring behind. In contrast to nicotine which preserves the actin cytoskeleton structures, ACh induces a reorganization of actin cytoskeleton with a loss of actomyosin ring and microvilli. At the same time, there is a redistribution of ZO-1 and to a lesser extend occludin from the intercellular junctions. Effect of cholinergic treatment was then evaluated on subjacent AJ proteins (**Figure 3**). Similar results were obtained with HT-29 and Caco-2 cells. In HT-29 cells, ACh also induces a loss of E-cadherin and catenins protein expres

Copyright © 2013 SciRes.

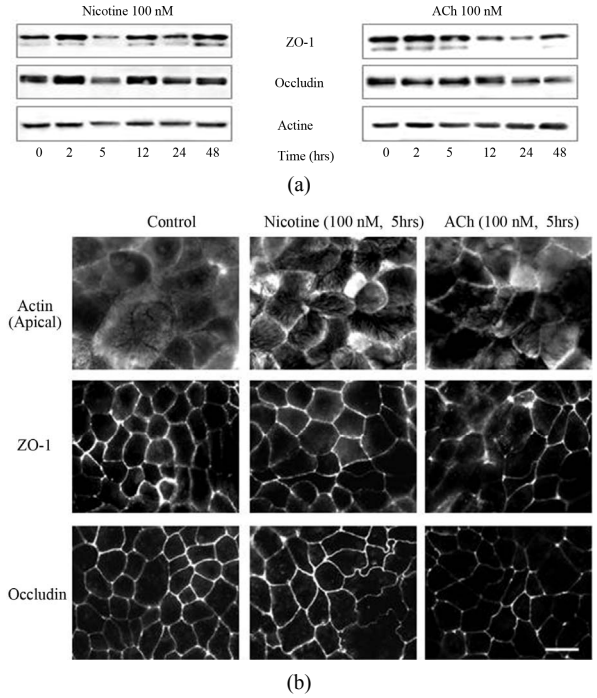


Figure 2. Cholinergic signaling modifies TJ protein expression and distribution. (a) Differentiated Caco-2 cells, which express TJ, are treated (or not) with nicotine or ACh (100 nM) during 0 to 48 hrs. Expressions of ZO-1 and occludin are analyzed by immunoblotting. Actin is used as a loading control. B: Immunofluorescence images of actin cytoskeleton organization at the apical pole and TJ protein distribution in Caco-2 incubated (or not) with nicotine or ACh (100 nM, 5 hrs). Scale bar: 20 µm.

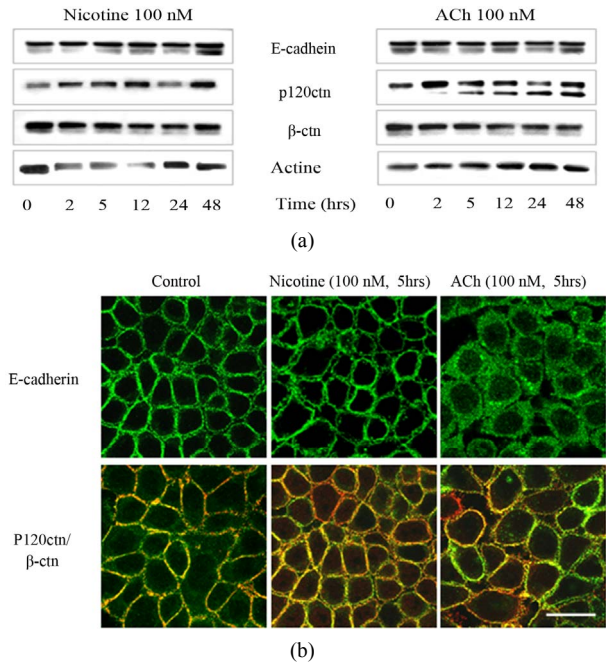


Figure 3. Cholinergic signaling modifies AJ protein expression and distribution. (a) HT-29 cells are treated (or not) with nicotine or ACh (100 nM) during 0 to 48 hrs. Expressions of E-cadherin, *β*-catenin and p120ctn are analyzed by immunoblotting. Actin is used as a loading control. (b) Confocal immunofluorescence images of AJ proteins. HT-29 cells which express AJ are incubated (or not) with nicotine or ACh (100 nM, 5 hrs. Upper panel: E-cadherin (green), lower panel: p120ctn (green), *β*-ctn (red). Co-localization of p120ctn and *β*-catenin is illustrated by yellow staining. Scale bar: 20 µm.

sion determined by western blots (**Figure 3(a)**). Confocal microscopy analysis showed that nicotine induces slight cell dissociation but E-cadherin was still at the membrane together with p120ctn/*β*-ctn. Both catenins were co-localized (**Figure 3(b)**). In presence of ACh, cells completely dissociated and E-cadherin staining was cytoplasmic. Membrane labelling of catenins also disappeared and less co-localization between the two proteins was observed.

Localization and stability of AJ proteins were controlled by phosphorylation/dephosphorylation events. The kinase Src is one of the kinases involved in this process and it can be activated by cholinergic ligands. We then compared the ability of nicotine and ACh to activate Src by measuring its phosphorylation on tyr418 (**Figure 4**). Exposure of HT-29 cells to nicotine doesn't induce any Src activation during the time course experiment. By contrast Ach treatment leads to a time-dependent activation of Src with a maximum at 5 hrs.

Altogether these data indicate that ACh but not nicotine induces an alteration of epithelial cell integrity characterized by a loss of TJ and AJ proteins subsequently to cell dissociation and protein endocytosis and degradation. This phenomenon could be address by the activation of

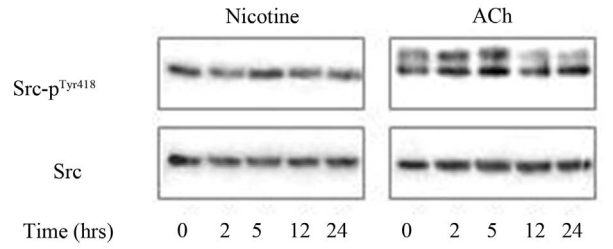


Figure 4. Src-phosphorylation following AChR activation. Westernblots showing Src-p^{Tyr418} and Src total expression following nicotine and ACh treatment (100 nM) during 0 to 24 hrs in HT-29 cells.

the Src kinase.

3.3. ACh Modifies Cell-ECM Adhesion and Stimulates Human Cancer Cell Invasion

The AJ's disassembly correlates with a loss of cell-cell adhesion and an acquisition of migratory potential [60]. This event is associated to a modification of cell-ECM adhesive properties. We then compared the adhesive potential of HT-29 cells treated or not with cholinergic re-

Copyright © 2013 SciRes.

ceptors on collagen IV (COIV) and laminin-332 (LN-332), two major proteins of the basal membrane (**Figure 5(a)**). Nicotinic treatment enhances cell adhesion to COIV and had no effect on LN-332. By contrast, exposure of HT-29 cells to ACh diminishes adhesion to both ECM proteins. These modifications of ACh-induced cell-ECM interactions were correlated to an enhanced capacity of HT-29 cell invasion (**Figure 5(b)**). Using Matrigel chamber assays, we found that ACh induced a 3-fold increase in HT-29 cell invasion. Nicotine had no effect on HT-29 cell invasion. These results indicate that activation of mAChR by ACh modifies cell adhesive proprieties in favour of invasion.

3.4. Ach Enhances Cell Proliferation

ACh is an autocrine/paracrine factor in various non neuronal cells. Consistent with previous observations, we found that ACh reproducibly induced a 1.7-fold increase in HT-29 cell proliferation at 48 hrs and 72 hrs after seeding (**Figure 6**). Nicotine also significantly stimulated HT-29 cell proliferation (1.3-fold increase).

In this present work, data indicate that ACh-induced mAChR signaling plays a key role in colon cancer cell polarity and adhesion, proliferation and invasion compared to nAChR.

4. Discussion

IBD patients suffer from chronic and relapsing intestinal inflammation that favours the development of CAC. This inflammation is initiated by aberrant activations of the innate immune responses associated to intestinal barrier defects. Recently, a number of animal studies have demonstrated that innate immune responses are attenuated by stimulation of the efferent arm of VN through its neurontransmitter ACh, that acts on resident macrophages $\alpha 7$ nAChR, [15,16]. It appeared that ACh is not only a neurotransmitter but it also acts as a signaling molecule in non-neuronal tissues. In the current study, we aimed to extend these findings to CAC prevention by treating human adenocarcinoma cell lines through targeting cholinergic receptors with nicotine and ACh. nAChRs and mAChRs might affect the inflammatory response in an opposite manner and may represent "the yin and yang" of the intestinal homeostasis [61]. Our data suggest that nAChR and mAChR might also affect differently cancer progression (**Figure 7**).

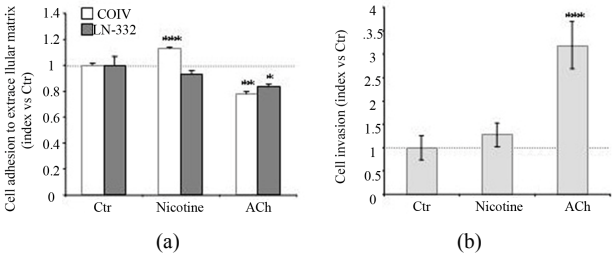


Figure 5. Cholinergic signaling modulates migration and invasion potential in HT-29 cells. (a) Contrary to mAChR signaling, nAChR activation promotes cell adhesion. HT-29 cells are treated (or not) with nicotine or ACh (100 nM, 5 hrs) 30 min before adhesion and then plated on either type IV collagen (COIV) or laminin-332 (LN-332) at 10 µg/mL. Cell adhesion is evaluated using a Cell Titer Aqueous MTT reagent kit. Results are expressed relative to the untreated cells which are fixed at 1. Data represent the mean +/- SEM of 4 experiments. (b) Contrary to nAChR signaling, mAChR activation favors cell migration. Effect of nicotine and ACh (100 nM, 48 hrs) on HT-29 cell transmigration is determined using a transwell assay. Cells which migrated through the matrigel are stained with hematoxylin and visualized and counted by phase contrast microscopy. Results are expressed according to the control which is fixed at 1. Data (n > 3) represent the mean +/− SEM.p

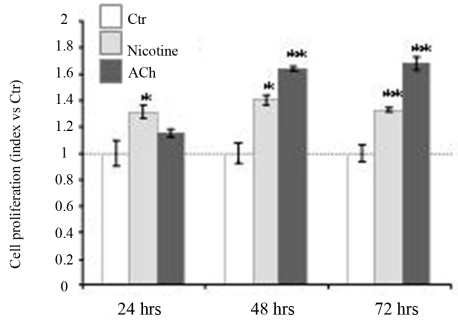


Figure 6. Cholinergic signaling modulates HT-29 cell proliferation. To determine proliferation potential, HT-29 cells are incubated (or not) with nicotine or ACh (100 nM) during 24, 48 and 72 hrs. Cell proliferation is determined by MTT assays. Results are expressed relative to the proliferation of untreated cells, which is fixed at 1. Data represent the mean +/− SEM of 3 experiments.

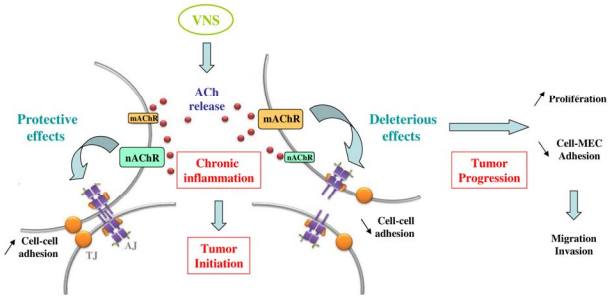


Figure 7. "The ying and the yang" effect of VNS. In IBD patients, VNS would have protective effects on epithelial barrier integrity via nAChR. This effect relies on a positive modulation of intercellular junction proteins in term of expression and localization. In an opposite manner, VNS-mediated activation of mAChR leads to cell-cell contact disruption with intercellular junction proteins degradation and delocalization together with a decrease of cell-ECM adhesion. Altogether these effects favor cell migration and invasion as observed in tumor progression.

Copyright © 2013 SciRes.

4.1. Acetylcholine, Neurotransmitter and Autocrine/Paracrine Mediator

Emerging evidences indicate that normal and neoplastic non-neuronal cells can produce and release ACh in sufficient quantity to modulate cell function [62]. Neuronal and non-neuronal (epithelial, endothelial and immune cells) ACh is synthesized by the enzyme choline acetyltransferase (ChAT) using acetyl-CoA and choline as substrates. The later is taken up from the extracellular site by a specific high affinity choline transport-system (CHT1) [62,63]. In contrast to the situation in nerves where ACh is stored in specific vesicles, there is no storage compartment in non-neuronal cells and ACh appeared to be released directly after synthesis. In both conditions, ACh is rapidly hydrolysed by acetylcholinesterase (AChE), thereby limiting its action to immediately neighbouring cells. ACh targets mAChR and nACR with a greater affinity for the former. Both receptors are widely expressed in different non-neuronal cell types (for review [64,65]. Different mAChRs couple differentially to multiple G proteins that are describe to mediate distinct cytoplasmic signaling pathways implicated in various cellular functions. Activation of nAChR leads to Ca^{2+} influx that directly modulates these signaling pathways.

4.2. Regulation of the Cholinergic System in Cancer

All components of the cholinergic system such as synthesis, storage, release, inactivation as well as the expression and function of various cholinergic receptors can be affected in pathophysiological conditions. Some substantial alterations of the non-neuronal cholinergic system have already described in human colon cancers. The cholinergic system for ACh synthesis and degradation is modified in human colon cancer cell lines compared to normal tissues. The activity of AChE was measured in 55 human samples of healthy and malignant colon, sigmoid colon and rectum. It appeared that cancer decreases the average of AChE activity value, such increasing the rate of ACh [66]. Moreover, Cheng and colleagues demonstrated that ChAT staining is undetectable to weak in normal enterocytes but is moderate to strong in 50% of colon cancer examined and colon cancer cell lines [67]. This data show that colon cancer cells possess the ability to produce and release ACh, which could act as an autocrine/paracrine factor. While there is few data on the regulation of ACh release during inflammation, it has been shown that corticoids negatively modulate the non-neuronal cholinergic system by regulating transport and synthesis of ACh in particular at the surface epithetlium of trachea and intestine [68].

In gastrointestinal tissue, the primary mAChR subunits are M1AChR, M2AChR and M3AChR, but colon epithelial cells mainly express M1AChR and M3AChR [38-40,69]. Frutcht et al. reported that human colon cancer cell lines and colon cancer tissues express M3AChR. Their expression is increased up to 8-fold in cancer compared to normal tissue [70]. This over-ex- pression is observed in 60% of colon cancer examined [71]. The over-expression of M3AChR is associated to a drop of degradation and an increasing of ACh synthesis. Corticoids also modulate the expression of mAChR, in a cell specific manner: glucocorticoids decrease M2AChR and M3AChR density in airway smooth muscles [72] while they up-regulated M2AChR in parasympathic nerves [73].

Since the discovery of ubiquitous presence of nAChR in mammalian cells, studies from many laboratories have linked nAChR with various pathological conditions including cancer [74]. These studies were performed with nicotine and concern tobacco-related carcinogenesis such as lung cancer. However it is clear that various nAChR subtypes are expressed in non-neuronal cells but their pattern of expression and their functional roles is under debate [65,75]. nAChRs are expressed in various human cancers with subunit expression altered except the α7-subunit, which is constantly expressed and functional (reviewed in cardinale *et al.*, 2012). It has been proposed that looking at the differentiation status of the tumor, there is a tendency of a major expression of α7 nAChR protein levels in more differentiated human lung tumors [76]. We found that the M3AChR and α7 nAChR are expressed in HT-29 and Caco-2. Their expression is not correlated to the differentiation status of these cell lines but rather to the cellular density. This result was confirmed using various human colonic cell lines characterized by different stage of differentiation (data not shown).

4.3. How mAChR May Participate in CAC?

Muscarinic receptor activation stimulates proliferation, migration and invasion of human colon cancer cells [77-79]. These effects have been attributed to M3AChR-induced secretion of matrix metalloprteinases (MMPs) such as MMP7 that releases EGF ligands or MMP1. Most of M3AChR effects seem to be mediated by transactivation of the EGFR. Co-expression of M3AChR and EGFR in many colon cancer cell lines associated with over expression of these receptors in the majority of colon cancer suggests that the functional interaction between M3AChR and EGFR is important for colon cancer regulation. In human colon cancer cell lines, we found that ACh alters the assembly of intercellular junctions (AJ and TJ), a process associated to epithelial barrier failure. This correlates with the observation that mAChR

Copyright © 2013 SciRes.

(in particular M3) increases epithelial cell permeability [80]. This ACh–induced alteration of cellular contacts, decreases cell-ECM adhesion and stimulates invasion of HT-29 cells. Recent research demonstrated that the molecular mechanism of cholinergic control of keratinocyte adhesion involves an ACh receptor-dependant changes in the phosphorylation status of adhesion [81,82]. The phosphorylation of adhesion molecules plays an important role in assembly/disassembly of intercellular junctions controlling their structural integrity and the adhesive capacity [83-86]. Tyrosine phosphorylation of p120ctn or serine phosphorylation of α-ctn correlate with a decrease of cell adhesion and represent the initial event for their degradation [87,88]. The phosphorylation status of a given adhesion molecule is determined by both protein kinase and phosphatase activities. Various kinases have been described to phosphorylate proteins among which the Src kinase [89,90]. We found that ACh but not nicotine induces Src phosphorylation on Tyr 418.

Strong evidences for non-neuronal ACh production are reported in human keratinocytes and small lung cancer cells where this transmitter acts as an autocrine/paracrine growth factor stimulating cell proliferation [91,92]. Similarly, ACh produced and released by H508 colon cancer cells interacts with M3AChR and acts as an autocrine growth factor [93]. In HT-29 cells, we found that ACh also stimulates cell proliferation. An increasing number of evidences suggests that cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression is associated with colon cancer induction and progression by stimulating cell proliferation, suppressing apoptosis, inducing tumor angiogenesis and promoting invasiveness [93]. However, M3AChR and Cox-2 share the same signaling cascade. M3AChR activation is coupled to the phospholipase C (PLC) signaling cascade and PLC-activated protein PKC is an inducer of Cox-2. In HT-29 cells, Yang and Frucht showed that stimulation of M3AChR by carbachol up-regulates COX-2 protein expression in a concentration and time- dependent manner [71]. So, Cox-2 could constitute the molecular bridge between inflammation and cancer, and mediate in part the effect of M3AChR.

Together, these finding indicate that M3AChR expression plays a strong role in intestinal tumor promotion by modulating key process of carcinogenesis. Using different *in vivo* models, Raufman *et al.*, showed that M3AChR gene ablation decreases both colon tumor number and size and the degree of dysplasia [94]. Indeed, only low-grade adenomas are detected from $Apc^{min/+}$ $M3AChR^{-/-}$ mice while in $Apc^{min/+}$ $M3AChR^{+/+}$ mice both low and high grade adenomas are observed [95]. Furthermore, M3AChR selective inhibitors have been proven to reduced the size of small cell lung cancer xenografts in nude mice [96] suggesting that M3AChR are key promoters of tumor growth.

4.4. Protective Effects of nAChR

As mAChR, nAChR have been described to modulate epithelial cell-cell contacts, adhesion and motility of respiratory epithelial cells, lung cancer and in a variety of human cancer cell lines [97-99]. Nicotine can induce the transition from a well-differentiated epithelial cell to a highly invasive carcinoma cell involving different signal transduction cascades. Long-term treatment of lung cancer and breast cancer cells is required for these effects. In these models it has been proposed that nicotine, acting via α7 nAChR, stimulates mRNA and protein expression of fibronectin with a concomitant down regulation of junctional protein expression and/or localisation [98,100, 101]. Evidence of nAChR mediated activation of integrin-dependent signaling pathway has also been obtained in colon and gastric cancer [102]. Regarding the gastrointestinal tract, Cho's laboratory showed that nicotine induced activation of α7 nAChR and stimulated the growth and angiogenesis of gastric and colon cancer by systemic as well as cellular increase in stress neurotransmitters (adrenaline, noradrenaline) leading to β-adrenergic signaling, transactivation of the EGFR and release of EGF [103-105].These finding strengthen the hypothesis that modulation of nAChR upon chronic exposition to tobacco may contribute to the development and progression of cancer.

However in some cases, nicotine and tobacco could exert protective effects. UC patients with a history of smocking usually developed their disease after they had stopped smocking [106-108]. Smoking has been found to reduce development and severity of UC and to worsen the disease in CD patients [106,109,110]. Similarly, nicotine administration ameliorates disease in DSS experimental colitis [111]; while worsened the course in TNBS colitis [112]. In patients, [113] treatment with transdermal nicotine was effective at inducing disease remission in UC patients but patients suffered from adverse effects [114]. Thus the effects of nicotine and α7 nAChR agonists may depend on many factors such as disease model and severity, the expression and the subtype of nAChRs. According to these data and our observations, it appeared that cholinergic receptor expression must be determined before VNS therapy.

Using a concentration similar to those observed in the blood of smokers (0.01 - 1 μM), we found that nicotine-mediated activation of α7 nAChR exert protective effect on epithelial morphology that can preserve from failure of barrier function. Nicotine increased or maintained the expression of various intercellular proteins such as p120ctn, Z0-1, Occludin. This mechanism may contribute to maintain barrier integrity. McGilligan has described similar results, showing that nicotine decrease Caco-2 permeability by regulating the expression of TJ proteins [115]. This process is important to reduce in-

Copyright © 2013 SciRes.

flammation but also cancer progression. In a rodent model of intestinal inflammation after severe burn injury, Costantini and collaborators showed that nicotine administration prevent burn-induced intestinal permeability and limited histological injury by controlling intercellular protein expression and localisation [116]. These effects could also be mediated by VNS of enteric nervous system [117].

Many mechanisms are responsible for the up-regulation of junction proteins by nicotine. One possibility is the activation of extracellular signal related kinase (ERK) or mitogen activated kinase (MAPK). Nicotine is described to increase the expression of these kinases [118, 119]. Another possibility is a nicotine-mediated decrease of the nuclear factor kappa B (NFkB). This factor has been described to regulate TJ permeability [120,121] and Cox-2 expression [122,123], a CRC tumor promoting factor [93]. Finally, α7 nAChR activation can regulate the stability of the junction proteins by controlling their phosphorylation status. Indeed, in keratinocytes, Chernyavsky *et al.*, showed that α7 nAChR activates adhesion molecules by both inhibiting Src family kinases and activating protein tyrosine phosphatases (PTP) [124]. nAChRs can be associated with both Src and PTP in large multimeric complexes controlling their activation [125].

Recently, nAChR has been implicated in regulating the release of the neurotransmitter γ-aminobuturic acid (GABA), which may act as a tumor suppressor in particular, in colon carcinoma and lung adenocarcinoma cells [126,127]. The heterotrimeric $\alpha 4\beta 2$ nAChR, which binds ACh and nicotine with higher affinity than α7 nAChR, stimulates the release of GABA. This higher affinity for nicotine is thought to cause the long-term inactivation (or desensitization) of the heteromeric nAChR that has been observed after chronic exposition to nicotine such as smokers. By contrast the sensibility of α7 nAChr remains unchanged, its expression is up-regulated by nicotine and its biological effect is increased [128].

The effect induced by nicotine may be different in various cell types, differentiated or "totipotent", and having diverse metabolic properties to convert nicotine in its metabolite such as cotinine which is more toxic. Moreover, these effects may be related to different factors such as: 1) length of exposure (short versus chronic); 2) concentration (high or low); 3) anatomical distribution and expression of receptor subtypes. Finally, the α7 nAChR effects could be modulated by the secreted mammalian LY-6/urokinase plasminogen activator receptor-related protein-1 (SLURP-1) that has been recently identified by an endogenous ligand for α7 nAChR which exerts protective effect [59].

4.5. Potential Therapeutic Use of VNS

To date different approaches have been done targeting nAChR in cancer therapy in particular tobacco-related carcinogenesis. In this case, the challenge is to develop compound capable of inhibiting α7 nAChR or potentiating $\alpha 4\beta 2$ nAChR to counterbalance the deleterious effects of chronic nicotine (for review [129]. Most promising compounds have side-effects in particular on the central nervous system since they can cross the blood-brain barrier. In improving the strategy for treating IBD patients, VNS could represent an attractive therapeutic approach to prevent CAC. VNS (afferent fibers) at high frequency (30 Hz) is already successfully used in humans in the treatment of depression, seizure and more recently metabolism troubles [30,31]. Now this technique could be extended to gastrointestinal disorders such as IBD using a low frequency stimulation (5 - 10 Hz) which is known to activate efferent fibers (for review [12]). In this condition, VNS uses a physiological anti-inflammatory pathway and represents a safe technique with even less side-effects. A reduction of inflammation is a key step for decrease the risk of CAC. However we should keep in mind that the nature and the subtype of cholinergic receptors on target cells should be carefully investigated before evaluating the effectiveness of nAChR as a drug target in these patients. Indeed, stimulation of mAChR play key role in colon cancer cell invasion.

5. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge grant support from Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, GEFLUC and ESPOIR. B. Ducarouge and M. Pelissier-Rota are the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. We thank Pierre-Emmanuel Buyse for his technical support.

REFERENCES

[1] M. Scharl and G. Rogler, "Inflammatory Bowel Disease: Dysfunc- tion of Autophagy?" *Digestive Disease*, Vol. 30, No. 3, 2012, pp. 12-19. doi:10.1159/000342588

[2] S. Danese and A. Mantovani, "Inflammatory Bowel Disease and Intestinal Cancer: A Paradigm of the Yin-Yang Interplay between Inflammation and Cancer," *Oncogene*, Vol. 29, No. 23, 2010, pp. 3313-3323. doi:10.1038/onc.2010.109

[3] M. Rutter, B. Saunders, K. Wilkinson, S. Rumbles, G. Schofield, M. Kamm, C. Williams, A. Price, I. Talbot and A. Forbes, "Severity of Inflammation Is a Risk Factor for Colorectal Neoplasia in Ulcerative Colitis," *Gastroenterology*, Vol. 126, No. 2, 2004, pp. 451-460. doi:10.1053/j.gastro.2003.11.010

[4] J. A. Eaden, K. R. Abrams and J. F. Mayberry, "The Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis," *Gut*, Vol. 48, No. 4, 2001, pp. 536-535. doi:10.1136/gut.48.4.526

Copyright © 2013 SciRes.

[5] M. D. Rutter, B. P. Saunders, K. H. Wilkinson, S. Rumbles, G. Schofield, M. A. Kamm, C. B. Williams, A. B. Price, I. C. Talbot and A. Forbes, "Thirty-Year Analysis of a Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis," *Gastroenterology*, Vol. 130, No. 4, 2006, pp. 1030-1038. doi:10.1053/j.gastro.2005.12.035

[6] A. Ekbom, M. Zack and H. O. Adami, "The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: A Large, Population-Based Study in Sweden," *Gastroenterology*, Vol. 100, No. 2, 1991, pp. 350-358.

[7] S. I. Grivennikov, "Inflammation and Colorectal Cancer: Colitis-Associated Neoplasia," *Seminars in Immunopathology*, Vol. 35, No. 2, 2013, pp. 229-244. doi:10.1007/s00281-012-0352-6

[8] H. S. Cooper, S. Murthy, K. Kido, H. Yoshitake and A. Flanigan, "Dysplasia and Cancer in the Dextran Sulfate Sodium Mouse Colitis Model. Relevance to Colitis-Associated Neoplasia in the Human: A Study of Histopathology, B-Catenin and p53 Expression and the Role of Inflammation," *Carcinogenesis*, Vol. 21, No. 4, 2000, pp. 757-768. doi:10.1093/carcin/21.4.757

[9] R. L. Shattuck-Brandt, G. W. Varilek, A. Radhika, F. Yang, M. K. Washington and R. N. DuBois, "Cyclooxygenase 2 Expression Is Increased in the Stroma of Colon Carcinomas from IL-10(-/-) Mice," *Gastroenterology*, Vol. 118, No. 2, 2000, pp. 337-345. doi:10.1016/S0016-5085(00)70216-2

[10] P. Sansone, G. Piazzi, P. Paterini, A. Strillacci, C. Ceccarelli, F. Minni, G. Biasco, P. Chieco and M. Bonafè, "Cyclooxygenase-2/Carbonic Anhydrase-IX Up-Regulation Promotes Invasive Potential and Hypoxia Survival in Colorectal Cancer Cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 13, No. 9, 2009, pp. 3876-3887. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00580.x

[11] K. Nys and S. Vermeire, "Autophagy: A New Target or an Old Strategy for the Treatment of Crohn's Disease?" *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2013, in Press.

[12] B. Bonaz, C. Picq, V. Sinniger, J. F. Mayol and D. Clarençon, "Vagus Nerve Stimulation: From Epilepsy to the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway," *Neurogastroenterology & Motility*, Vol. 25, No. 3, 2013, pp. 208-221. doi:10.1111/nmo.12076

[13] C. Cheyuo, A. Jacob, R. Wu, M. Zhou, G. F. Coppa and P. Wang, "The Parasympathetic Nervous System in the Quest for Stroke Therapeutics," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol. 31, 2011, pp. 1187-1195. doi:10.1038/jcbfm.2011.24

[14] V. A. Pavlov and K. J. Tracey, "The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway," *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol. 19, No. 6, 2005, pp. 493-499.

[15] L. V. Borovikova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton and K. J. Tracey, "Vagus Nerve Stimulation Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Endotoxin," *Nature*, Vol. 405, No. 6785, 2000, pp. 458-462. doi:10.1038/35013070

[16] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura and K. J. Tracey, "Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha7 Subunit Is an Essential Regulator of Inflammation," *Nature*, Vol. 421, No. 6921, 2003, pp. 384-388. doi:10.1038/nature01339

[17] K. J. Tracey, "The Inflammatory Reflex," *Nature*, Vol. 420, No. 6917, 2002, pp. 853-859. doi:10.1038/nature01321

[18] K. J. Tracey, "Physiology and Immunology of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 117, No. 2, 2007, pp. 289-296. doi:10.1172/JCI30555

[19] A. Miyazawa and N. Unwin, "Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore," *Nature*, Vol. 423, No. 6943, 2003, pp. 949-955. doi:10.1038/nature01748

[20] J. Wess, "Molecular Biology of Muscarinic Acetylcholine Receptors," *Critical Reviews in Neurobiology*, Vol. 10, No. 1, 1996, pp. 69-99. doi:10.1615/CritRevNeurobiol.v10.i1.40

[21] L. G. Paleari, A. Cesario and P. Russo, "The Cholinergic System and Cancer," *Seminars in Cancer Biology*, Vol. 18, No. 3, 2008, pp. 211-217. doi:10.1016/j.semcancer.2007.12.009

[22] M. Sopori, "Effects of Cigarette Smoke on the Immune System," *Nature Reviews Immunology*, Vol. 2, No. 5, 2002, pp. 372-377. doi:10.1038/nri803

[23] C. J. Czura, S. G. Friedman and K. J. Tracey, "Neural Inhibition of Inflammation: The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway," *Journal of Endotoxin Research*, Vol. 9, No. 6, 2003, pp. 409-413.

[24] L. Ulloa, "The Vagus Nerve and the Nicotinic Anti-Inflammatory Pathway," *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 4, No. 8, 2005, pp. 673-684. doi:10.1038/nrd1797

[25] H. M. Schuller, "Nitrosamines as Nicotinic Receptor Ligands," *Life Sciences*, Vol. 80, No. 24-25, 2007, pp. 2274-2280. doi:10.1016/j.lfs.2007.03.006

[26] D. J. van Westerloo, I. A. Giebelen, S. Florquin, M. J. Bruno, G. J. Larosa, L. Ulloa, K. J. Tracey and T. van der Poll, "The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice," *Gastroenterology*, Vol. 130, No. 6, 2006, pp. 1822-1830. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.022

[27] J. E. Ghia, P. Blennerhassett, H. Kumar-Ondiveeran, E. F. Verdu and S. M. Collins, "The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated with Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model," *Gastroenterology*, Vol. 131, No. 4, 2006, pp. 1122-1130. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.016

[28] J. Meregnani, D. C, M. Vivier, A. Peinnequin, C. Mouret, V. Sinniger, C. Picq, A. Job, F. Canini, M. Jacquier-Sarlin and B. Bonaz, "Anti-Inflammatory Effect of Vagus Nerve Stimulation in a Rat Model of Inflammatory Bowel Disease," *Autonomic Neuroscience*: *Basic and Clinical*, Vol. 160, No. 1, 2011, pp. 82-89. doi:10.1016/j.autneu.2010.10.007

[29] F. The, C. Cailotto, J. van der Vliet, W. J. de Jonge, R. J. Bennink, R. M. Buijs and G. E. Boeckxstaens, "Central Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway

Copyright © 2013 SciRes.

Reduces Surgical Inflammation in Experimental Post-Operative Ileus," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 163, No. 5, 2011, pp. 1007-1016. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01296.x

[30] A. H. Milby, C. H. Halpern and G. H. Baltuch, "Vagus Nerve Stimulation for Epilepsy and Depression," *Neurotherapeutics*, Vol. 5, No. 1, 2008, pp. 75-85. doi:10.1016/j.nurt.2007.10.071

[31] V. A. Pavlov and K. J. Tracey, "The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex—Linking Immunity and Metabolism," *Nature Reviews Endocrinology*, Vol. 8, 2012, pp. 743-754. doi:10.1038/nrendo.2012.189

[32] S. P. Hussain, L. J. Hofseth and C. C. Harris, "Radical Causes of Cancer," *Nature Reviews Cancer*, Vol. 3, No. 6, 2003, pp. 267-285. doi:10.1038/nrc1046

[33] G. K. Zupanc, I. Horschke and D. A. Lovejoy, "Corticotropin Releasing Factor in the BRain of the Gymnotiform Fish, *Apteronotus leptorhynchus*: Immunohistochemical Studies Combined with Neuronal Tract Tracing," *General and Comparative Endocrinology*, Vol. 114, No. 3, 1999, pp. 349-364.doi:10.1006/gcen.1999.7273

[34] P. M. O'Connor, T. K. Lapointe, P. L. Beck and A. G. Buret, "Mechanisms by Which Inflammation May Increase Intestinal Cancer Risk in Inflammatory Bowel Disease," *Inflammatory Bowel Diseases*, Vol. 16, No. 8, 2010, pp. 1411-1420. doi:10.1002/ibd.21217

[35] J. Terzić, S. Grivennikov, E. Karin and M. Karin, "Inflammation and Colon Cancer," *Gastroenterology*, Vol. 138, No. 6, 2010, pp. 2101-2114.

[36] O. M. Kalashnyk, G. L. Gergalova, S. V. Komisarenko and M. V. Skok, "Intracellular Localization of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Cell Lines," *Life Sciences*, Vol. 91, No. 21-22, 2012, pp. 1033-1037. doi:10.1016/j.lfs.2012.02.005

[37] C. L. Hirota and D. M. McKay, "Cholinergic Regulation of Epithelial Ion Transport in the Mammalian Intestine," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 149, No. 5, 2006, pp. 463-479. doi:10.1038/sj.bjp.0706889

[38] R. Kopp, G. Lambrecht, E. Mutschler, U. Moser, R. Tacke and A. Pfeiffer, "Human HT-29 Colon Carcinoma Cells Contain Muscarinic M_3 Receptors Coupled to Phosphoinositide Metabolism," *European Journal of Pharmacology*: *Molecular Pharmacology*, Vol. 172, No. 4-5, 1989, pp. 397-405. doi:10.1016/0922-4106(89)90021-7

[39] K. E. J. Dickinsona, R. A. Frizzellb and M. C. Sekar, "Activation of T84 Cell Chloride Channels by Carbachol Involves a Phosphoinositide-Coupled Muscarinic M3 Receptor," *European Journal of Pharmacology*: *Molecular Pharmacology*, Vol. 225, No. 4, 1992, pp. 291-298. doi:10.1016/0922-4106(92)90102-2

[40] K. E. O'Malley, C. B. Farrell, K. M. O'Boyle and A. W. Baird, "Cholinergic Activation of Cl-Secretion in Rat Colonic Epithelia," *European Journal of Pharmacology*, Vol. 275, No. 1, 1995, pp. 83-89.

[41] P. Simon-Assmann, M. Kedinger, A. De Arcangelis, V. Rousseau and P. Simo, "Extracellular Matrix Components in Intestinal Development," *Experientia*, Vol. 51, No. 9-10, 1995, pp. 883-900. doi:10.1007/BF01921739

[42] M. Aumailley and T. Krieg, "Laminins: A Family of Diverse Multifunctional Molecules of Basement Membranes," *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 106, No. 2, 1996, pp. 209-214. doi:10.1111/1523-1747.ep12340471

[43] J.-F. Beaulieu, "Extracellular Matrix Components and Integrins in Relationship to Human Intestinal Epithelial Cell Differentiation," *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 31, No. 4, 1997, pp. 1-76. doi:10.1016/S0079-6336(97)80001-0

[44] S. Miyamoto, S. K. Akiyama and K. M. Yamada, "Synergistic Roles for Receptor Occupancy and Aggregation in Integrin Transmembrane Function," *Science*, Vol. 267, No. 5199, 1995, pp. 883-885. doi:10.1126/science.7846531

[45] M. A. Schwartz, M. D. Schaller and M. H. Ginsberg, "Integrins: Emerging Paradigms of Signal Transduction," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 11, No. 1, 1995, pp. 549-599. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.003001

[46] Z. Hossain and T. Hirata, "Molecular Mechanism of Intestinal Permeability: Interaction at Tight Junctions," *Molecular BioSystems*, Vol. 4, No. 12, 2008, pp. 1181-1185. doi:10.1039/b800402a

[47] C. M. Niessen, "Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function," *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 127, 2007, pp. 2535-2532. doi:10.1038/sj.jid.5700865

[48] J. A. Jankowski, F. K. Bedford and Y. S. Kim, "Changes in Gene Structure and Regulation of E-Cadherin during Epithelial Development, Differentiation, and Disease," *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 57, 1997, pp. 187-215. doi:10.1016/S0079-6603(08)60281-0

[49] A. Zweibaum, M. Pinto, G. Chevalier, E. Dussaulx, N. Triadou, B. Lacroix, K. Haffen, J.-L. Brun and M. Rousset, "Enterocytic Differentiation of a Subpopulation of the Human Colon Tumor Cell Line HT-29 Selected for Growth in Sugar-Free Medium and Its Inhibition by Glucose," *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 122, No. 1, 1985, pp. 27-29. doi:10.1002/jcp.1041220105

[50] N. T. Chartier, M. Laine, S. Gout, G. Pawlak, C. A. Marie, P. Matos, *et al.*, "Laminin-5-Integrin Interaction Signals through PI 3-Kinase and Rac1b to Promote Assembly of Adherens Junctions in HT-29 Cells," *Journal of Cell Science*, Vol. 119, 2006, pp. 31-46. doi:10.1242/jcs.02698

[51] E. A. Wayner, S. G. Gil, G. F. Murphy, M. S. Wilke and W. G. Carter, "Epiligrin, a Component of Epithelial Basement Membranes, Is an Adhesive Ligand for Alpha 3 Beta 1 Positive T Lymphocytes," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 121, No. 5, 1993, pp. 1141-1152. doi:10.1083/jcb.121.5.1141

[52] J. B. Weitzman, R. Pasqualini, Y. Takada and M. E. Hemler, "The Function and Distinctive Regulation of the Integrin VLA-3 in Cell Adhesion, Spreading, and Homotypic Cell Aggregation," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 12, 1993, pp. 8651-8657.

[53] A. E. Summers, C. J. Whelan and M. E. Parsons, "Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits and Receptor Activity in the Epithelial Cell Line HT29," *Life Sciences*,

Copyright © 2013 SciRes.

Vol. 72, No. 18-19, 2003, pp. 2091-2094. doi:10.1016/S0024-3205(03)00089-4

[54] C. Huet, C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier and D. Louvard, "Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 105, No. 1, 1987, pp. 345-357. doi:10.1083/jcb.105.1.345

[55] S. P. Gout, M. R. Jacquier-Sarlin, L. Rouard-Talbot, P. Rousselle and M. R. Block, "RhoA-Dependent Switch between Alpha2Beta1 and Alpha3Beta1 Integrins Is Induced by Laminin-5 during Early Stage of HT-29 Cell Differentiation," *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 12, No. 10, 2001, pp. 3268-3281.

[56] S. Gout, C. Marie, M. Lainé, G. Tavernier, M. R. Block and M. Jacquier-Sarlin, "Early Enterocytic Differentiation of HT-29 Cells: Biochemical Changes and Strength Increases of Adherens Junctions," *Experimental Cell Research*, Vol. 299, No. 2, 2004, pp. 498-510. doi:10.1016/j.yexcr.2004.06.008

[57] J. Fogh, "Human Tumor Cells *in Vitro*," Plenum Press, New York, 1975, pp. 115-141.

[58] H. P. S. Wong, L. Yu, E. K. Y. Lam, E. K. K. Tai, W. K. K. Wu and C. H. Cho, "Nicotine Promotes Cell Proliferation via Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptor and Catecholamine-Synthesizing Enzymes-Mediated Pathway in Human Colon Adenocarcinoma HT-29 Cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 221, No. 3, 2007, pp. 261-267. doi:10.1016/j.taap.2007.04.002

[59] A. Pettersson, L. Nilsson, G. Nylund, A. Khorram-Manesh, S. Nordgren and D. S. Delbro, "Is Acetylcholine an Autocrine/Paracrine Growth Factor via the Nicotinic Alpha7-Receptor Subtype in the Human Colon Cancer Cell Line HT-29?" *European Journal of Pharmacology*, Vol. 609, No. 1-3, 2009, pp. 27-33. doi:10.1016/j.ejphar.2009.03.002

[60] C. D'Souza-Schorey, "Disassembling Adherens Junctions: Breaking Up Is Hard to Do," *Trends in Cell Biology*, Vol. 15, No. 1, 2005, pp. 19-26. doi:10.1016/j.tcb.2004.11.002

[61] S. Razani-Boroujerdi, M. Behl, F. F. Hahn, J. C. Pena-Philippides, J. Hutt and M. L. Sopori, "Role of Muscarinic Receptors in the Regulation of Immune and Inflammatory Responses," *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 194, No. 1, 2008, pp. 83-88. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.11.019

[62] I. Wessler, C. J. Kirkpatrick and K. Racké, "Non-Neuronal Acetylcholine, a Locally Acting Molecule, Widely Distributed in Biological Systems: Expression and Function in Humans," *Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 77, No. 1, 1998, pp. 59-79. doi:10.1016/S0163-7258(97)00085-5

[63] T. Okuda and T. Haga, "High-Affinity Choline Transporter," *Neurochemical Research*, Vol. 28, No. 3-4, 2003, pp. 483-488. doi:10.1023/A:1022809003997

[64] K. Racké, U. R. Juergens and S. Matthiesen, "Control by Cholinergic Mechanisms," *European Journal of Pharmacology*, Vol. 533, No. 1-3, 2006, pp. 57-68. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.050

[65] I. Wessler and C. J. Kirkpatrick, "Acetylcholine beyond Neurons: The Non-Neuronal Cholinergic System in Humans," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 154, No. 8, 2008, pp. 1558-1571. doi:10.1038/bjp.2008.185

[66] M. F. Montenegro, F. Ruiz-Espejo, F. J. Campoy, E. Muñoz-Delgado, M. Páez de la Cadena, F. J. Rodríguez-Berrocal and C. J. Vidal, "Cholinesterases Are Down-Expressed in Human Colorectal Carcinoma," *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 63, No. 18, 2006, pp. 2175-2182. doi:10.1007/s00018-006-6231-3

[67] K. R. Cheng, R. Samimi, G. F. Xie, J. Shant, C. Drachenberg, M. Wade, R. J. Davis, G. Nomikos and J.-P. Raufman, "Acetylcholine Release by Human Colon Cancer Cells Mediates Autocrine Stimulation of Cell Proliferation," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol. 295, No. 3, 2008, pp. G591-G597. doi:10.1152/ajpgi.00055.2008

[68] I. Wessler, T. Reinheimer, H. Klapproth, F.-J. Schneider, K. Racké and R. Hammer, "Mammalian Glial Cells in Culture Synthesize Acetylcholine," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol. 356, No. 5, 1997, pp. 694-697. doi:10.1007/PL00005107

[69] J.-P. Raufman, R. Samimi, N. Shah, S. Khurana, J. Shant, C. Drachenberg, G. F. Xie, J. Wess and K. R. Cheng, "Genetic Ablation of M3 Muscarinic Receptors Attenuates Murine Colon Epithelial Cell Proliferation and Neoplasia," *Cancer Research*, Vol. 68, 2008, pp. 3573-3578. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6810

[70] H. Frucht, R. T. Jensen, D. Dexter, W. L. Yang and Y. Xiao, "Human Colon Cancer Cell Proliferation Mediated by the M3 Muscarinic Cholinergic Receptor," *Clinical Cancer Research*, Vol. 5, No. 9, 1999, pp. 2532-2539.

[71] W.-L. Yang and H. Frucht, "Cholinergic Receptor Up-Regulates COX-2 Expression and Prostaglandin E(2) Production in Colon Cancer cells," *Carcinogenesis*, Vol. 21, No. 10, 2000, pp. 1789-1793. doi:10.1093/carcin/21.10.1789

[72] C. W. Emala, J. Clancy and C. A. Hirshman, "Glucocorticoid Treatment Decreases Muscarinic Receptor Expression in Canine Airway Smooth Muscle," *American Journal of Physiology*, Vol. 272, No. 4, 1997, pp. L745-L751.

[73] D. B. Jacoby, B. L. Yost, B. Kumaravel, Y. Chan-Li, H.-Q. Xiao, K. Kawashima and A. D. Fryer, "Glucocorticoid Treatment Increases Inhibitory M(2) Muscarinic Receptor Expression and Function in the Airways," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 24, No. 4, 2001, pp. 485-91. doi:10.1165/ajrcmb.24.4.4379

[74] H. M. Schuller, "Cell Type Specific, Receptor-Mediated Modulation of Growth Kinetics in Human Lung Cancer Cell Lines by Nicotine and Tobacco-Related Nitrosamines," *Biochemical Pharmacology*, Vol. 38, No. 20, 1989, pp. 3439-3442. doi:10.1016/0006-2952(89)90112-3

[75] C. Gotti and F. Clementi, "Neuronal Nicotinic Receptors: From Structure to Pathology," *Progress in Neurobiology*, Vol. 74, No. 6, 2004, pp. 363-396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006

[76] Russo P CA, Cardinale A., "Presentation to the Special Issue: 'α7-Nicotinic Receptor (α7-nAChR): One Target Different Diseases'," *Current Drug Targets*, Vol. 13, No. ,

Copyright © 2013 SciRes.

2012, 573.

[77] J.-P. Raufman, J. Shant, G. F. Xie, K. R. Cheng, X.-M. Gao, B. Shiu, N. Shah, C. B. Drachenberg, J. Heath, J. Wess and S. Khurana, "Muscarinic Receptor Subtype-3 Gene Ablation and Scopolamine Butylbromide Treatment Attenuate Small Intestinal Neoplasia in Apcmin/+ Mice," *Carcinogenesis*, Vol. 32, No. 9, 2011, pp. 1396-1402. doi:10.1093/carcin/bgr118

[78] A. Belo, K. R. Cheng, A. Chahdi, J. Shant, G. F. Xie, S. Khurana and J.-P. Raufman, "Muscarinic Receptor Agonists Stimulate Human Colon Cancer Cell Migration and Invasion," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol. 300, No. 5, 2011, pp. G749-G760. doi:10.1152/ajpgi.00306.2010

[79] K. Cheng, P. Zimniak and J. P. Raufman, "Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Cholinergic Agonist-Induced Proliferation of H508 Human Colon Cancer Cells," *Cancer Research*, Vol. 63, No. 20, 2003, pp. 6744-6750.

[80] H. L. Cameron and M. H. Perdue, "Muscarinic Acetylcholine Receptor Activation Increases Transcellular Transport of Macromolecules across Mouse and Human Intestinal Epithelium *in Vitro*," *Neurogastroenterology & Motility*, Vol. 19, No. 1, 2007, pp. 47-56. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x

[81] V. T. Nguyena, J. Arredondoa, A. I. Chernyavskya, Y. Kitajimab and S. A. Grando, "Keratinocyte Acetylcholine Receptors Regulate Cell Adhesion," *Life Sciences*, Vol. 72, No. 18-19, 2003, pp. 2081-2085. doi:10.1016/S0024-3205(03)00087-0

[82] Nguyen VT AJ, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Pittelkow M, Grando SA., "Pemphigus Vulgaris IgG and Methylprednisolone Exhibit Reciprocal Effects on Keratinocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, 2004, pp. 2135-2146. doi:10.1074/jbc.M309000200

[83] S. Alemà and A. M. Salvatore, "p120 Catenin and Phosphorylation: Mechanisms and Traits of an Unresolved Issue," *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*)-*Molecular Cell Research*, Vol. 1773, No. 1, 2007, pp. 47-58. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.001

[84] E. Calautti, M. Grossi, C. Mammucari, Y. Aoyama, M. Pirro, Y. Ono, J. Li and G. P. Dotto, "Fyn Tyrosine Kinase Is a Downstream Mediator of Rho/PRK2 Function in Keratinocyte Cell-Cell Adhesion," *The Journal of Cell Biology*, Vol. 156, No. 1, 2002, pp. 137-148. doi:10.1083/jcb.200105140

[85] J. Lilien, J. Balsamo, C. Arregui and G. Xu, "Turn-Off, Drop-Out: Functional State Switching of Cadherins," *Developmental Dynamics*, Vol. 224, No. 1, 2002, pp. 18-29. doi:10.1002/dvdy.10087

[86] M. Serresa, O. Filholb, H. Lickertc, C. Grangeassed, E. M. Chambazb, J. Stappertc, C. Vincenta and D. Schmitt, "The Disruption of Adherens Junctions Is Associated with a Decrease of E-Cadherin Phosphorylation by Protein Kinase CK2," *Experimental Cell Research*, Vol. 15, No. 2, 2000, pp. 255-264. doi:10.1006/excr.2000.4895

[87] S. Dupre-Crochet, A. Figueroa, C. Hogan, E. C. Ferber, C. U. Bialucha, J. Adams, E. C. N. Richardson and Y. Fujita, "Casein Kinase 1 Is a Novel Negative Regulator of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts," *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 27, No. 10, 2007, pp. 3804-3816. doi:10.1128/MCB.01590-06

[88] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler, "Beta-Catenin Is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway," *The EMBO Journal*, Vol. 16, 1997, pp. 3797-3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797

[89] B. C. Elias, T. Suzuki, A. Seth, F. Giorgianni, G. Kale, L. Shen, J. R. Turner, A. Naren, Dominic M. Desiderio and Radhakrishna Rao, "Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in Occludin Prevents Its Interaction with ZO-1 and Destabi-Lizes Its Assembly at the Tight Junctions," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, 2009, pp. 1559-1569. doi:10.1074/jbc.M804783200

[90] A. Kourtidis, S. P. Ngok and P. Z. Anastasiadis, "p120 Catenin: An Essential Regulator of Cadherin Stability, Adhe-Sion-Induced Signaling, and Cancer Progression," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 116, 2013, pp. 409-432. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2

[91] P. F. Song, H. S. Sekhon, Y. B. Jia, J. A. Keller, J. K. Blusztajn, G. P. Mark and E. R. Spindel, "Acetylcholine Is Synthesized by and Acts as an Autocrine Growth Factor for Small Cell Lung Carcinoma," *Cancer Research*, Vol. 63, No. 1, 2003, pp. 214-221.

[92] T. Schlereth., F. Birklein, K. an Haack, S. Schiffmann, H. Kilbinger, C. J. Kirkpatrick and I. Wessler, "*In Vivo* Release of Non-Neuronal Acetylcholine from the Human Skin as Measured by Dermal Microdialysis: Effect of Botulinum Toxin," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 147, No. 2, 2006, pp. 183-187. doi:10.1038/sj.bjp.0706451

[93] R. Y. Huang and G. G. Chen, "Cigarette Smoking, Cyclooxygenase-2 Pathway and Cancer," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1815, No. 2, 2011, pp. 158-169.

[94] J. P. Raufman, R. Samimi, N. Shah, S. Khurana, J. Shant, C. Drachenberg, G. Xie, J. Wess and K. Cheng, "Genetic Ablation of M3 Muscarinic Receptors Attenuates Murine Colon Epithelial Cell Proliferation and Neoplasia," *Cancer Research*, Vol. 68, No. 10, 2008, pp. 3573-3578. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6810

[95] G. P. Boivin, K. Washington, K. Yang, J. M. Ward, T. P. Pretlow, R. Russell, D. G. Besselsen, V. L. Godfrey, T. Doetschman, W. F. Dove, H. C. Pitot, R. B. Halberg, S. H. Itzkowitz, J. Groden and R. J. Coffey, "Pathology of Mouse Models of Intestinal Cancer: Consensus Report and Recommendations," *Gastroenterology*, Vol. 124, No. 3, 2003, pp. 762-77. doi:10.1053/gast.2003.50094

[96] P. Song, H. S. Sekhon, A. Lu, J. Arredondo, D. Sauer, C. Gravett, G. P. Mark, S. A. Grando and E. R. Spindel, "M3 Muscarinic Receptor Antagonists Inhibit Small Cell Lung Carcinoma Growth and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Induced by Acetylcholine Secretion," *Cancer Research*, Vol. 67, No. 8, 2007, pp. 3936-3944. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2484

[97] S. Zia, A. Ndoye, V. T. Nguyen and S. A. Grando, "Nicotine Enhances Expression of the Alpha 3, Alpha 4, Alpha 5, and Alpha 7 Nicotinic Receptors Modulating Calcium

Copyright © 2013 SciRes.

Metabolism and Regulating Adhesion and Motility of Respiratory Epithelial Cells," *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, Vol. 97, No. 3, 1997, pp. 243-262.

[98] P. Dasgupta, W. Rizwani, S. Pillai, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, Banerjee S, Carless M, Kim E, Coppola D, Haura E, Chellappan S., "Nicotine induces Cell Proliferation, Invasion and Epithelial-Mesenchymal Transition in a Variety of Human Cancer Cell Lines," *International Journal of Cancer*, Vol. 124, No. 1, 2009, pp. 35-36. doi:10.1002/ijc.23894

[99] R. Davis, W. Rizwani, S. Banerjee, M. Kovacs, E. Haura, D. Coppola and S. Chellappan, "Nicotine Promotes Tumor Growth and Metastasis in Mouse Models of Lung Cancer," *PLoS One*, Vol. 4, No. 10, 2009, Article ID: e7524. doi:10.1371/journal.pone.0007524

[100] J. E. Michaelson, J. R. Ritzenthaler and J. Roman, "Regulation of Serum-Induced Fibronectin Expression by Pro- tein Kinases, Cytoskeletal Integrity, and CREB," *Ameri- can Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 282, 2002, pp. L291-L301.

[101] Y. Zheng, J. D. Ritzenthaler, J. Roman and S. W. Han, "Nicotine Stimulates Human Lung Cancer Cell Growth by Inducing Fibronectin Expression," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 37, No. 6, 2007, pp. 681-690. doi:10.1165/rcmb.2007-0051OC

[102] P. L. Wei, L. J. Kuo, M. T. Huang, W. C. Ting, Y. S. Ho, W. Wang, J. An and Y. J. Chang, "Nicotine Enhances Colon Cancer Cell Migration by Induction of Fibronectin," *Annals of Surgical Oncology*, Vol. 18, No. 6, 2011, pp. 1782-1790. doi:10.1245/s10434-010-1504-3

[103] H. P. S. Wong, L. Yu, E. K. Y. Lam, E. K. K. Tai, W. K. K. Wu and C. H Cho, "Nicotine Promotes Colon Tumor Growth and Angiogenesis through Beta-Adrenergic Activation," *Toxicological Sciences*, Vol. 97, No. 2, 2007, pp. 279-287. doi:10.1093/toxsci/kfm060

[104] V. Y. Shin, W. K. K. Wu, Y. N. Ye, W. H. L. So, M. W. L. Koo, E. S. L. Liu, *et al*., "Nicotine Promotes Gastric Tumor Growth and Neovascularization by Activating Extracellular Signal-Regulated Kinase and Cyclooxygenase-2," *Carcinogenesis*, Vol. 25, No. 12, 2004, pp. 2487-2495. doi:10.1093/carcin/bgh266

[105] V. Y. Shin, W. K. K. Wu, K. M. Chu, H. P. S. Wong, E. K. Y. Lam, E. K. K. Tai, *et al*., "Nicotine Induces Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Association with Tumor-Associated Invasion and Angiogenesis in Gastric Cancer," *Molecular Cancer Research*, Vol. 3, 2005, pp. 607-615. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0106

[106] R. D. Pullan, J. Rhodes, S. Ganesh, V. Mani, J. S. Morris, G. T. Williams, R. G. Newcombe, M. Russell, C. Feyerabend, G. Thomas, *et al*., "Transdermal Nicotine for Active Ulcerative Colitis," *The New England Journal of Medicine*, Vol. 330, 1994, pp. 811-815. doi:10.1056/NEJM199403243301202

[107] J. Rhodes and G. Thomas, "Nicotine Treatment in Ulcerative Colitis," *Drugs*, Vol. 49, No. 2, 1995, pp. 157-160. doi:10.2165/00003495-199549020-00001

[108] J. R. Ingram, P. Routledge, J. Rhodes, R. W. Marshall, D. C. Buss, B. K. Evans, *et al*., "Nicotine Enemas for Treatment of Ulcerative Colitis: A Study of the Pharmacokinetics and Adverse Events Associated with Three Doses of Nicotine," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 20, No. 8, 2004, pp. 859-865. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02199.x

[109] B. Tanja and B. Ulrich, "Inflammatory Bowel Disease and Smoking: A Review of Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutic Implications," *Inflammatory Bowel Diseases*, Vol. 10, No. 6, 2004, pp. 848-859. doi:10.1097/00054725-200411000-00019

[110] W. J. Sandborn, "Severe Ulcerative Colitis," *Current Treatment Options in Gastroenterology*, Vol. 2, No. 2, 1999, pp. 113-118. doi:10.1007/s11938-999-0038-x

[111] J. E. Ghia, P. Blennerhassett, H. Kumar-Ondiveeran, E. F. Verdu and S. M. Collins, "The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated with Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model," *Gastroenterology*, Vol. 131, No. 4, 2006, pp. 1122-1130. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.016

[112] S. A. Snoek, M. I. Verstege, E. P. van der Zanden, N. Deeks, D. C. Bulmer, M. Skynner, *et al*., "Selective Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Worsen Disease in Experimental Colitis," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 160, No. 2, 2010, pp. 322-333. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00699.x

[113] A. P. Sykes, C. Brampton, S. Klee, C. L. Chander, C. Whelan and M. E. Parsons, "An Investigation into the Effect and Mechanisms of Action of Nicotine in Inflammatory Bowel Disease," *Inflammation Research*, Vol. 49, No. 7, 2000, pp. 311-319. doi:10.1007/s000110050597

[114] J. McGrath, J. W. Mcdonald and J. K. Macdonald, "Transdermal Nicotine for Induction of Remission in Ulcerative Colitis," *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol. 18, No. 4, 2004, Article ID: CD004722.

[115] V. E. McGilligan, J. M. W. Wallace, P. M. Heavey, D. L. Ridley and I. R. Rowland, "The Effect of Nicotine *in Vitro* on the Integrity of Tight Junctions in Caco-2 Cell Monolayers," *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 45, No. 9, 2007, pp. 1593-1598. doi:10.1016/j.fct.2007.02.021

[116] T. W. Costantini, M. Krzyzaniak, G. A. Cheadle, J. G. Putnam, A. M. Hageny, N. Lopez, *et al*., "Targeting α-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in the Enteric Nervous System: A Cholinergic Agonist Prevents Gut Barrier Failure after Severe Burn Injury," *The American Journal of Pathology*, Vol. 181, No. 2, 2012, pp. 478-486. doi:10.1016/j.ajpath.2012.04.005

[117] T. W. Costantini, V. Bansal, M. Krzyzaniak, J. G. Putnam, C. Y. Peterson, W. H. Loomis, *et al*., "Vagal Nerve Stimulation Protects against Burn-Induced Intestinal Injury through Activation of Enteric Glia Cells," *American Journal of Physiology*, *Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol. 299, No. 6, 2010, pp. G1308-G1318. doi:10.1152/ajpgi.00156.2010

[118] C. Bose, H. Zhang, K. B. Udupa and P. Chowdhury, "Activation of p-ERK1/2 by Nicotine in Pancreatic Tumor Cell Line AR42J: Effects on Proliferation and Secretion," *American Journal of Physiology*, *Gastrointestinal and*

Copyright © 2013 SciRes.

Liver Physiology, Vol. 289, No. 5, 2005, pp. G926-G934. doi:10.1152/ajpgi.00138.2005

[119] H. Nakayama, S. Ueno, T. Ikeuchi and H. Hatanaka, "Regulation of Alpha3 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit mRNA Levels by Nerve Growth Factor and Cyclic AMP in PC12 Cells," *Journal of Neurochemistry*, Vol. 74, No. 4, 2000, pp. 1346-1354. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741346.x

[120] T. Y. Ma, G. K. Iwamoto, N. T. Hoa, V. Akotia, A. Pedram, M. A. Boivin, *et al*., "TNF-Alpha-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Requires NF-Kappa B Activation," *American Journal of Physiology*, *Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol. 286, No. 3, 2004, pp. G367-G376. doi:10.1152/ajpgi.00173.2003

[121] E. Hollenbach, M. Neumann, M. Vieth, A. Roessner, P. Malfertheiner and M. Naumann, "Inhibition of p38 MAP Kinase- and RICK/NF-kappab-Signaling Suppresses Inflammatory Bowel Disease," *FASEB Journal*, Vol. 18, No. 13, 2004, pp. 1550-1552.

[122] C. C. Hsu, J. C. Lien, C. W. Chang, C. H. Chang, S. C. Kuo and T. F. Huang, "Yuwen02f1 Suppresses LPS-Induced Endotoxemia and Adjuvant-Induced Arthritis Primarily through Blockade of ROS Formation, NFkB and MAPK Activation," *Biochemical Pharmacology*, Vol. 85, No. 3, 2013, pp. 385-395. doi:10.1016/j.bcp.2012.11.002

[123] S. A. Benitah, P. F. Valerón and J. C. Lacal, "ROCK and Nuclear factor-KappaB-Dependent Activation of Cyclooxygenase-2 by Rho GTPases: Effects on Tumor Growth and Therapeutic Consequences," *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14, No. 7, 2003, pp. 3041-3054. doi:10.1091/mbc.E03-01-0016

[124] A. I. Chernyavsky, J. Arredondo, T. Piser, E. Karlsson and S. A. Grando, "Differential Coupling of M_1 Muscarinic and Alpha7 Nicotinic Receptors to Inhibition of Pemphigus Acantholysis," *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 2008, pp. 3401-3408. doi:10.1074/jbc.M704956200

[125] M. L. van Hoek, C. S. Allen and S. J. Parsons, "Phosphotyrosine Phosphatase Activity Associated with c-Src in Large Multimeric Complexes Isolated from Adrenal Medullary Chromaffin Cells," *The Biochemical Journal*, Vol. 326, Pt. 1, 1997, pp. 271-277.

[126] J. Joseph, B. Niggemann, K. S. Zaenker and F. Entschladen, "The Neurotransmitter Gamma-Aminobutyric Acid Is an Inhibitory Regulator for the Migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells," *Cancer Research*, Vol. 62, No. 22, 2002, pp. 6467-6469.

[127] H. M. Schuller, H. A. N. Al-Wadei and M. Majidi, "$GABA_B$ Receptor Is a Novel Drug Target for Pancreatic Cancer," *Cancer*, Vol. 112, No. 4, 2008, pp. 767-778. doi:10.1002/cncr.23231

[128] H. Kawai and D. K. Berg, "Nicotinic Acetylcholine Receptors Containing Alpha 7 Subunits on Rat Cortical Neurons Do Not Undergo Long-Lasting Inactivation Even When Up-Regulated by Chronic Nicotine Exposure," *Journal of Neurochemistry*, Vol. 78, No. 6, 2001, pp. 1367-1378. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00526.x

[129] P. Ambrosi and A. Becchetti, "Targeting Neuronal Nicotinic Receptors in Cancer: New Ligands and Potential Side-Effects," *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, Vol. 8, No. 1, 2013, pp. 38-52.

Copyright © 2013 SciRes.

Nicotine-induced cellular stresses and autophagy in human cancer colon cells: a supportive effect on cell homeostasis via up-regulation of Cox-2 and PGE_2 production

Marjolaine A. Pelissier-Rota [1, 2], Ludovic Pelosi [3, 4], Patrick Meresse [5] and Muriel R. Jacquier-Sarlin [1, 2, $]

Address: *1: INSERM U836, Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, BP 170, Grenoble Cedex 09, F-38042, France. 2: Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170 Grenoble Cedex 09, F-38041, France. 3: CNRS UMR 5163, Equipe Génomique et Evolution des Microorganismes, BP170 Grenoble Cedex 9, F-38042, France. 4: Université Joseph Fourier, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, BP170 Grenoble Cedex 09, F-38041, France. 5: Université Joseph Fourier, Centre Universitaire de Biologie Expérimentale, BP 53, Grenoble Cedex 09, F-38041, France.*

[$]To whom correspondence should be addressed: Muriel Jacquier-Sarlin, *Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences. Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France*. Tel.: (+33) 456-52-06-50; Fax: (+33) 456-52-05-54; E-mail: muriel.jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr

Running title: ***Nicotine regulation of colon epithelial cells homeostasis by PGE2***

***Keywords*:** nicotine, colorectal cancer, autophagy, Cox-2, PGE_2, cell homeostasis.

Abbreviations: nAChR: nicotinic acetylcholine receptor, IBD: inflammatory bowel disease, Cox-2: Cyclooxygenase 2, PGE_2: prostaglandin E2, UC: ulcerative colitis, ROS: reactive oxygen species, PI3-K: phosphatidylinositol-3-kinase.

ABSTRACT

Previous studies revealed that cigarette smoke protects against ulcerative colitis (UC). Nicotine, one of the active components in cigarette smoke, may contribute to this effect. Furthermore, the nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit (α7nAChR) expressed on immune cells, is an essential regulator of inflammation. Since intestinal epithelial cells also expressα7nAChR, we investigated how nicotine could participate in the homeostasis of epithelial cells. First, using the human adenocarcinoma cell line HT-29, we revealed that nicotine, which triggers an influx of extracellular Ca^{2+} following α7nAChR stimulation, induces mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production associated with an increase in the mitochondrial membrane potential and endoplasmic reticulum stress. This results in caspase-3 activation, which in turn induces apoptosis. Additionally, we have shown that nicotine induces a PI3-K dependent up-regulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression and prostaglandin E2 (PGE_2) production. In this context, we suggest that this key mediator participates in the cytoprotective effects of nicotine against apoptosis by stimulating autophagy and cell survival in colon cancer cells. Our results are discussed with respect to published data for nicotine stresses. They provide new insight into the mechanism by which nicotine could protect from UC and suggest an anti-inflammatory role for the cholinergic pathway at the epithelial cell level.

SUMMARY

In the intestine, inflammation is controlled by the integrity of the epithelium barrier and the regulation of the immune system. Cox-2-derived PGE_2 production contributes to nicotine regulation of epithelial cell homeostasis via the cholinergic system.

Introduction:

Cigarette smoking is the biggest contributor to death and morbidity in people (Gellert & Scho, 2012). Although cigarette smoke contains hundreds of substances, nicotine and/or its metabolites, are recognized as being the major psychoactive compound associated with smoking. These effects are made possible by the activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) expressed in neuronal as well non-neuronal cells. nAChRs belong to the superfamily of pentameric ligand-gated ion channels formed by the combination of ten alpha (α1 to β10) and four beta (β1 to β4) subunits that respond to acethylcholine (ACh), choline or nicotine. They can assemble as hetero-orhomo-pentamers, which differ in their cation selectivity, their kinetic properties, desensitization and also in their cellular or subcellular localization [1].

The role of nicotine on disease development is somewhat a paradigm. On one hand, nicotine has been described as having a role in cancer initiation as well as tumor promotion and progression (for review [2]). In fact, nAChRs regulate basal cellular functions such as adhesion, motility, migration, survival and proliferation, but also participate in angiogenesis which is crucial for tumor growth and metastasis (review in [3–6]). On the other hand, a large number of studies have demonstrated the neuroprotective actions of nicotine against various stressors leading to neuronal death [7]. Smoking is also accepted as a factor that affects the disease course for inflammatory bowel disease (IBD) patients as well as aggravating Crohn's disease (CD) while having beneficial effects on ulcerative colitis (UC) [8–12]. Indeed, numerous studies demonstrate that smoking not only appears to protect against disease development but also ameliorates the clinical course of UC [13,14]. In contrast, UC smokers who stop smoking show an exacerbation in their disease course and have been shown to have an increase in hospitalization and greater need for immunosuppressants and corticosteroids [15–18].

In fact, no single mechanism adequately explains the effects of smoking on IBD. Some possible theories consider the effects of smoking on cellular and humoral immunity, cytokines production, antioxidant and oxygen free radicals, gut permeability, and on microbiota. Mononuclear cells from smokers with CD were functionally impaired whereas cells from healthy smokers or smokers with UC were not affected. These altered cells secreted lower levels of chemokines and cytokines and showed a defective sensitivity to anti-inflammatory or antioxidant protection [19]. Recently, it has been shown that cholinergic signalling may regulate gut immunity and inflammation (for review[20]). Indeed, ACh modulates macrophage activity at different cellular levels (cytokines production, phagocytosis and killing) and though distinct nicotinic receptors [20–25]. Thus, it is possible that nicotine also regulates this pathway. An unexplored process concerns the signalling of nAChR expressed on intestinal epithelial cells. In IBD, the alteration of intestinal barrier function is recognized as a key event that perpetuates the disease course. Using HT-29 and Caco2-TC7 cells, two human colonic adenocarcimoma cell lines, our previous work highlights that nicotine-mediated activation of nAChRs preserves epithelium integrity by maintaining intercellular junctions and protects epithelium barrier functions against stressful mediators thus limiting inflammation [26]. Finally, defective autophagy, which plays a significant role in several disorders, including metabolic, infectious and autoimmune diseases, neurodegeneration, aging and cancer, would promote essentially the onset of IBD [27,28]. Indeed, four genes associated with autophagy in humans have been confirmed as CD, but not as UC susceptibility genes [29,30]. Autophagy is a highly conserved lysosome-mediated catabolic process that facilitates cellular homeostasis by generating energy and degrading non-essential or damaged cellular constituents such as organelles or proteins following various stressing conditions [31,32]. If this network is incapable of repairing the damage or

overcoming the continued stress, the default pathway of apoptosis is engaged, destroyingthe cell. As many of the diseases associated with dysfunction of autophagy results in oxidative stresses, autophagy has been proposed as an essential cellular antioxidant pathway (for review [33,34]).

Cyclooxygenase-2 (Cox-2), one of the key enzymes of arachidonic acid metabolism and prostaglandin (PG) synthesis, has been described to participate in IBD as well as in the early stages of colorectal carcinogenesis. In colon cancer, chronic inflammation plays a crucial role in conditioning the regional environment and promoting development of cancers [35]. Nicotine has been shown to up-regulate Cox-2 expression and activity *in-vitro* and *in-vivo*. The resulting release of PGs leads to damage of the epithelial cells and may facilitate colon cancer progression by stimulating cell proliferation and survival, tumour cell invasiveness and production of angiogenic agents (For review [36–41]). Therapeutic approaches using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), conventional and selective Cox-2 inhibitors have been widely used for the treatment of IBD and prevention offurther colon cancer development. While these drugs exert chemo-preventive effects on colorectal carcinogenesis, they may also participate in the relapse or exacerbation of IBD[42,43].

According to: i) the paradoxical effect of both, nicotine on CD versus UC patients and PGs on IBD versus colon cancer evolution, ii) the defective autophagy in CD patients, we hypothesized that tobacco-induced protection in UC patients may result from nicotine-stimulated autophagy. For this purpose, using HT-29 cells we investigated the ability of nicotine to induce autophagy and we addressed the signalling pathway involved with this response. We found that following activation of nAChR, nicotine increases mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and induces mitochondrial and endoplasmic reticulum stresses. These effects are combined with Cox-2 up-regulation and PGE_2-dependent induction of autophagy. This processcontributes to the maintenance of cell homeostasis by regulating both survival and apoptotic balance and so may be useful for IBD patients.

Experimental Procedure

Cell culture:
The human colon adenocarcinoma cell line, HT-29, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) was cultured at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, 5% Penicillin and streptomycin. The human GFP-LC3 construct was cloned into the pBabe expression vector. Retro viral infections of HT-29 cells are done as described previously [44] and then cultured in a medium containing 2mg/ml puromycin (BD Biosciences).

Chemical reagents and Antibodies:
Polyclonal antibodies directed against actin and Cox-2 were provided by Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Polyclonal antibodies directed against LC3 and cytochrome c were obtained from Cell Signaling (Ozyme, St Quentin Yvelines, France). Polyclonal anti-GRP78 was provided by Santa Cruz (Heidelberg, Germany). Polyclonal antibodies directed against active caspase-3 were obtained from Abcam (Paris, France) and polyclonal anti-caspase-12 was purchased from Gene Tex. Horse Radish Peroxydase-conjugated goat anti-mouse antibodies were provided by Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit antibodies were provided by Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France).Nicotine, H2O2, rotenone and myxothiazol (two mitochondrial respiratory chain inhibitors), U0126 (a MEK inhibitor), LY294002 (a PI3-K inhibitor), NS398 (a Cox-2 inhibitor) and EGTA (Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-*N,N,N′,N′*-tetraaceticacid, a calcium chelator) were obtained from Sigma Aldrich.

Analysis of intracellular calcium concentration
HT-29 cells were plated in 96-well culture plates for fluorescence experiments (5.10^4 cells/ well) for 24 h at 37°C. The following day, cells were assayed for a calcium response to nicotine using the Fluo-4 Direct™ assay (Invitrogen).An equivalent volume of 2X Fluo-4 Direct calcium reagent was added to each well according to the manufacturer's instructions and then incubated for 30 min at 37°C followed by an additional 30 min at room temperature. Thesecells were then washed and incubated in a Hepes-buffered solution containing 0,1 or 5 mM Ca^{2+} or EGTA (50 mM) and stimulated with nicotine (100 nM). Fluorescence was monitored in real-time using instrument settings appropriate for excitation at 494 nm and emission at 516 nm (microplate reader PHERAstar Plus, BMG LABTECH).Measurements are given in relative fluorescence units as the maximum response minus the minimum response divided by the minimum response.

Westernblot analysis:
Total lysates or subcellular fractions were processed for immunoblot testing as previously described [44]. Primary antibodies anti- Cox-2, capases-3 and -12, GRP78/BIP, HSP70, LC3 and cytochrom c were used at 1:1000) while anti-actin was used at 1:2000. In each experiment, actin expression was used as a loading control.To analyze the relative expression of LC3 protein, we used a Ready Gel precastwith 4-20 % of acrylamide (Biorad).

Measurement of reactive oxygen species (ROS)

NBT assay: HT-29 cells were plated in 24-well tissue culture plates (5.10^5 cells/well) for 36h at 37°C. Then the cells were treated with nicotine (100 nM) for the indicated times. After removal of the cell medium, the cells were washed twice with PBS and then incubated with 100 µL Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma Aldrich) 0.25% (w/v) in DMEM medium without red phenol) at 37°C for 1h. The reduced NBT was solubilized with 100 µL KOH 2M and 100 µL DMSO for 15 min. The absorbance was measured for each well at 620 nm. Starvation was used as a positive control.

Mitochondrial ROS assay:Intracellular ROS levels were assessed using dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Invitrogen). HT-29 cells were plated in 24-well culture plates (5.10^5 cells/ well) for 36h at 37°C. The cells were pre-incubated for 30 min with 5 µM DHR 123 (diluted in the cell medium). Before nicotine stimulation (100 nM, 5 or 30 min), cells were pre-incubated for 10 min with (or without) rotenone (100 µM) or myxothiazol (100 µM). Following incubation, the wells were washed twice with PBS, harvested using accutase (PAA) and centrifuged at 1500rpm for 10 min at 4°C. Pellets were re-suspended in 500 µL of PBS and cells were lysed by sonication (30 W, 10 s). Lysates were centrifuged (1500 rpm, 4°C, 10 min) and 100 µL of the supernatant was used to assess the fluorescence (485-520 nm) on the microplate reader PHERAstar Plus, BMG LABTECH.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Changes in $\Delta\Psi_m$ were determined using the Mitochondrial Membrane Potential probe (JC-1 Dye)in accordancewith the manufacturer's procedures (molecular Probes, Invitrogen). H_2O_2 (50 nM, 30 min) was used as a positive control.

Immunofluorescent microscopy analysis: Cells were grown on glass coverslips and following the indicated treatments, they were incubated with 200 µL JC-1 (5 µg/mL) for 20 min at 37°C. Then, cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde (pH 7.4)/ 2% (w/v) sucrose. The red (intact mitochondrial membrane potential) (λ_{ex}= 585 nm, λ_{em}=590 nm) and green (damaged mitochondrial membrane potential) (λ_{ex}= 510 nm, λ_{em}= 527 nm) fluorescence intensities were observedusing an epifluorescence microscope with a100x objective (ZEISS, AvioVert 200 M).

*Flow cytometry analysis:*HT-29 cells were treated with nicotine (100 nM) for the indicated time, then washed twice with PBS, and incubated with JC-1 (2 µg/mL) at 37°C for 15 min. The washed cells were analysed by flow cytometry for JC-1 fluorescence on a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson). Mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence intensity ratio. The potential-sensitive colour shift is due to the concentration-dependent formation of red fluorescent J-aggregates. The total number of cells analysed for each sample was 10000 and raw data were processed using the FACS Diva6 software (Becton Dickinson).

Immunofluorescent microscopy

Cells were grown on glass coverslips and treated as described earlier (Chartier et al., 2011). After fixation with 4% (v/v) paraformaldehyde (pH 7.4) / 2% (w/v) sucrose, non-specific sites were blocked for 1 h at 37°C with 3% (w/v) BSA-0.5% (v/v) Tween20. Cells were then incubated for 1 h at 37°C with specific antibodies which were diluted in the blocking solution at 1:100 for primary and 1:500 for secondary antibodies. Coverslips were permanently mounted with Mowiol (Calbiochem). Fluorescence photomicrographs were taken using a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510) or an epifluorescence microscope with a 100x objective (ZEISS, AxioVert 200 M).

Table 1: Primer sequence for RT-PCR analysis

Primer	Sequence	Length (pb)	Tm(°C)	Number of cycles
ATG7	GTGGGCCCTTTAGTCTCGTA TAGGACGTTGATGGGTTGGG	1668	57.5	35
Beclin	ACGTTGAGCTGAGTGTCCAG AAGTTTTCCGGCGGCTACC	604	59.5	35
GAPDH	TGTCGACAGTCAGCCGCATT CCACGACGTACTCAGCGCCA	350	60	29

Table 2: Nicotine induces apoptose.

	Live cells (%)	Dead cells (%)	Apoptotic cells (%)
Control	83.5±5.8	14.8±0.6	8.7±0.5
Control / NS398	79.6±3.4	20.4±1.3	11±1.2
Nicotine 100 nM (2 h)	65.7±4.2	35.4±3.5	27.9±2.6
Nicotine 100 nM (2 h) / NS398	75.8±4.7	24.5±2.4	17.3±1.8
Nicotine 100 nM (5 h)	70.2±5.3	30.8±3.1	22.4±2.4
Nicotine 100 nM (5 h) / NS398	77.9±6.9	23.2±0.9	9.8±0.7

Mitochondria localization was determined using the CellLight® Mitochondria-RFP, BacMam 2.0procurred from molecular Probes (Invitrogen) and used in accordance with the manufacturer"s instructions. Briefly, HT-29 cells were incubated overnight directly with the CellLight® reagent and then treated with nicotine (100 nM) for the indicated times.

RT-PCR and PCR:
Total RNA extractions were performed using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer"s instructions. 2 µg of total RNA were denaturized and subsequently processed for reverse transcription using the M-MLV (Euromedex) according to the manufacturer"s instructions and then run on a thermocycler (Eppendorf). Primer sequences and working conditions are indicated in table 1. PCR conditions were: 5 min at 92°C followed by numbers of cycles depending on the primers (40 s at 92°C, 40 s at Tm and 1 min at 72°C) and 10 min at 72°C. PCR were analysed on 1% (w/v) agarose gel. Quantification is performed using Image J (NIH software). GAPDH was used as housekeeping gene.

Subcellular fractionation:
Subcellular fractionations 10^7 cells were lyzed in 1 mL of hypotonic buffer (0.34 M saccharose, 5mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 7.4) containing protease inhibitor cocktails (Sigma Aldrich) by 40 passages through a dounce homogenizer and subsequent centrifugation for 15 min at 500 g at 4°C. The pellet corresponded to the nuclear fraction. Supernatants were centrifuged (7000 rpm, 5 min, 4°C) to produceendosome-enriched fractions (pellet). The supernatant was withdrawn and further centrifuged for 10 min at 14700 rpm at 4°C to obtain lysosomes and mitochondria -enriched fractions (pellet). Finally, supernatants were centrifuged at 100000 rpm for 30 min at 4°C to produce cytosol (supernatant) and endoplasmic reticulum enriched fractions (pellet). Each pellet was suspended in lysate buffer. Protein amounts corresponding to the same number of cells were routinely analysed for westernblotting.

PGE_2 synthesis:
HT-29 cells were plated in 24-well plates (5.10^5 cells/well) for 24 h at 37°C. The following day, both pre-incubated and non-incubated cells with NS398 (10 µM, ON) were stimulated with nicotine (100 nM) for the indicated times. Cells were washed twice with PBS, lysed in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) buffer and sonicated (30 W, 10 s). Prostaglandin E2 synthesis was assessed using a PGE_2 ELISA kit (Enzo Life Sciences) according to the manufacturer"s procedure.

Caspase-3 activity assay:
HT-29 cells were plated in 96-well plates (2.10^4 cells/well). Cells were left as-is or pre-treated with either LY294002 (25 µM, 1 h) or NS398 (10 µM, ON) and then stimulated (or not) with nicotine (100 nM) for 24 h. DEVDase activity was measured using the fluorometric Caspase 3/7 Glo assay (Promega) according to the manufacturer"s procedure.

Cell viability:
Briefly, HT-29 cells were seeded into 96-well plates (2.10^4 cells/well) and incubated at 37°C. The following day, inhibitors (LY294002 25 µM, NS398 10 µM) and nicotine (100nM) were added to their respective wells for 24, 48 and 72h at 37°C. The medium was changed each day. Before quantification, the plate was washed three times with PBS

to discard dead cells. Cell quantification was performed using the CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions. The absorbance at 490 nm was recorded using an ELISA plate reader. Each point represents the mean value ± SD of three independent experiments. Untreated cells were used as a control.

Annexin-V/propidium Iodide (PI) assay:
Apoptotic cells were detected using an Annexin-V-Fluo staining kit (BD Biosciences). HT-29 cells were plated in 6-well plates (1.10^6 cells/well) for 24h at 37°C. The following day, cells were either pre-treated or not with NS398 (10 µM, ON) then stimulated with nicotine (100 nM) for the indicated times. Thesecells were then harvested, rinsed with cold PBS twice, mixed into 100 µL of binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4) and then incubated with an Annexin V-FITC /PI double staining solution at room temperature in the dark for 15 min. Stained cells were immediately analysed by flow cytometry (Becton Dickinson, FACS Canto II). The total number of cells analysed for each sample was 10000. The percentage of apoptotic cells was calculated using FACS Diva6 software (Becton Dickinson).

Densitometry analysis and statistics:
Experiments were repeated at least three times with consistent results. Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. All graphs represent the mean value ± SD of protein expression levels measured using the densitometry analysis method found in the "Image J" software (NIH). The relative expression levels of mRNA or proteins were determined as follows: the expression level of each transcript or protein was normalized to i) their housekeeping gene in RT-PCR; ii) to actin in whole lysate westernblots. In some experiments and in order to display a fold increase over control, the relative expression of transcripts or proteins in control conditions was set to 1. Statistics performed are unpaired t-tests and statistical significance is given by the number of asterisks (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Quantification of GFP-LC3 positive punctuate dots:
EGFP-LC3 positive punctuate dots were taken in six random fields per slide using a fluorescence microscope at 100X magnitude (Zeiss, AxioVert200M). The punctuate dots were counted in a blind manner. The data were presented as EGFP-LC3-positive punctuate dots/cell. The values shown represent the average obtained for 3-5 experiments.

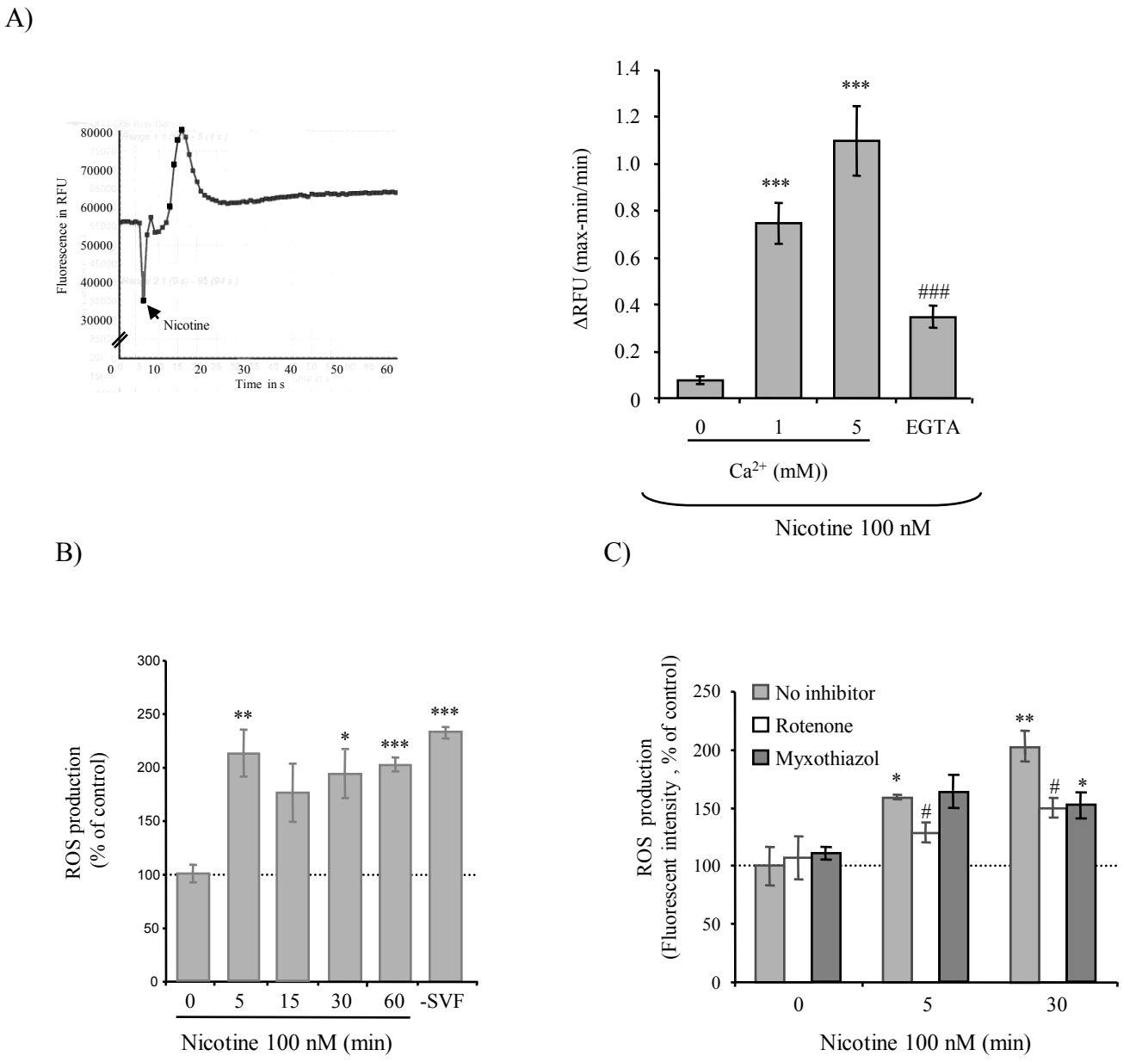


Figure 1:*Nicotine stimulation provokes calcium flux andmitochondrial ROS production.*

A) *Nicotine-induced Ca^{2+} influx in HT-29 cells.* The intracellular concentration of $Ca^{2+}$was monitored in real-time from cells loaded with Fluo-4/AM, as described in the Materials and methods section. Trace indicates representative Ca^{2+} influx in HT-29 cells. Nicotine (100 nM) induced a transient rise in the Fluo-4 fluorescence (left panel). Effects of extracellular Ca^{2+}concentrations on the peak magnitude of nicotine-induced Ca^{2+}response (right panel). HT-29 cells were pre-incubated in Hepes-buffered solution containing 0, 1 or 5 mM Ca^{2+} or EGTA (50 mM) and stimulated with nicotine (100 nM). Measurements are given in relative fluorescent units as the maximum response minus the minimum response divided by the minimum response. The results are expressed as means ± SD, n=15). B) *Nicotine-induced ROS production*. HT-29 cells were incubated with (or without) nicotine (100 nM) between 5 and 60 min. Starvation was used as a positive control. After removal of the cell medium, cells were washed twice and incubated with 100 µL of NBT at 37° C for 1 h. Reduced NBT was solubilized and the absorbance was measured at 620 nm. ROS production was expressed in % of control (untreated cells). Data represents means ± S.E. * $p < 0,05$ *vs.* untreated cells (0 min) ** $p < 0,01$ *vs.* untreated cells (0 min), *** $p < 0,001$ *vs.* untreated cells (0 min). C) *Nicotine-induced mitochondrial ROS production*. HT-29 cells were treated with DHR 123, a fluorescent probe, for 30 min at 37° C. Nicotine stimulated (100 nM, 5-30 min) HT-29 cells were pre-incubated with (or without) two inhibitors of the respiratory chain: rotenone (100 µM, 10 min, complex I inhibitor) or myxothiazol (100 µM, 10 min, complex III inhibitor). Fluorescence was measured at 485-520 nm. Fluorescent intensity was expressed in % of control (cells untreated). Data represents means ± SD *$p < 0,05$ $_{vs.}$ nicotine 0 min, **$p < 0,01$ $_{vs.}$ nicotine 0 min. # $p< 0,05$ vs. nicotine 5 min.

RESULTS

Nicotine induces calcium influx in HT-29 cells

It has been shown that stimulation of nAChR with nicotine triggers an increase in intracellular calcium levels, which then regulates diverse biological functions depending on the activation of specific signalling cascades [45]. To test the functionality of nAChR in HT-29 cells, we first investigated the ability of nicotine to mobilize Ca^{2+} in these cells. The intracellular calcium level was monitored in real-time from cells loaded with Fluo-4/AM, a Ca^{2+}-sensitive fluorescence probe.Nicotine (100 nM) induced a transient rise in the Fluo-4 fluorescence (Figure 1A, left panel). The intensity was increased significantly in a $[Ca^{2+}]$ extracellular-dependent manner (0-5 mM) indicating a nicotine-induced Ca^{2+} influx into the HT-29 cells (Figure 1A, right panel). The Ca^{2+} chelator EGTA (50 mM) reduced the intracellular concentration of Ca^{2+} in absence of nicotine (data not shown) probably after membrane diffusion, and reduced (~68% inhibition) but did not eliminate the nicotine-indicated rise in $[Ca^{2+}]$ suggesting that intracellular mobilization of Ca^{2+} also occurred together with the Ca^{2+} influx in response to the nicotine. Disruption of calcium homeostasis is one of the characteristic events associated with an alteration in mitochondrial or endoplasmic reticulum (ER) functions. Thus, the impact of nicotine on the physiology of these two structures will be further addressed.

Nicotine induces mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS) in HT-29 cells

Recently, calcium flux has been shown to be associated with oxidative stress as the initiation or main contributorto nicotine-induced nAChr signalling [46]. The oxidative effect of nicotine on HT-29 cells was first investigated using an NBT reduction assay (Figure 1B). HT-29 cells exposed to nicotine (100 nM) significantly increased the production of intracellular ROS during the first hour of treatment. Privation of serum that has been described to generate ROS has been used as a positive control (-SVF). Pre-treatment with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC, 40 mM) only prevented the initial level of ROS (ROS produced in control cells) but not the nicotine-induced production of ROS (data not shown). Considering that mitochondria are the main sources of ROS production in intestinal epithelial cells, we used the mitochondrial ROS fluorescent probe of dihydrorhodamine 123 (DHR123) to confirm the source of nicotine-mediated ROS production. DHR123 is oxidized to cationic rhodamine that accumulates in mitochondrial membranes and exhibits green fluorescence. As shown in Figure 1C, short exposure to nicotine (100 nM, 5 to 30 min) significantly increases fluorescence and consequently mitochondrial ROS production. However when cells were pre-treated for 10 min with the complex I inhibitor of the respiratory chain (rotenone, 100 µM) before the administration of nicotine, the fluorescence significantly decreases compared to the levels found in cells without inhibitor. Myxothiazol (a complex III inhibitor, 100 µM) had a significant inhibitory effect but only at 30 min.These data suggest that nicotine induced the production of mitochondria-derived ROS in HT-29 cells.

Nicotine-induced ROS production is associated to mitochondrial depolarization

It has been reported that the ROS level in cells correlates with the induction of mitochondrial permeability dysfunctions. Variability of the mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi m$) in HT-29 cells following nicotine treatment was evaluated using the mitochondrion-sensitive dye JC1, as shown in Figure 2. JC1 selectively enters into mitochondria and reversibly changes ofcolour from red to green according to the $\Delta\psi m$ value. In healthy cells with high $\Delta\psi m$, JC1 forms complexes with red fluorescence whereas in cells with low $\Delta\psi m$, JC1 remains in the monomeric form and fluoresces green. Mitochondrial integrity was first evaluated by fluorescence microscopy (Figure 2A). In control cells, JC1

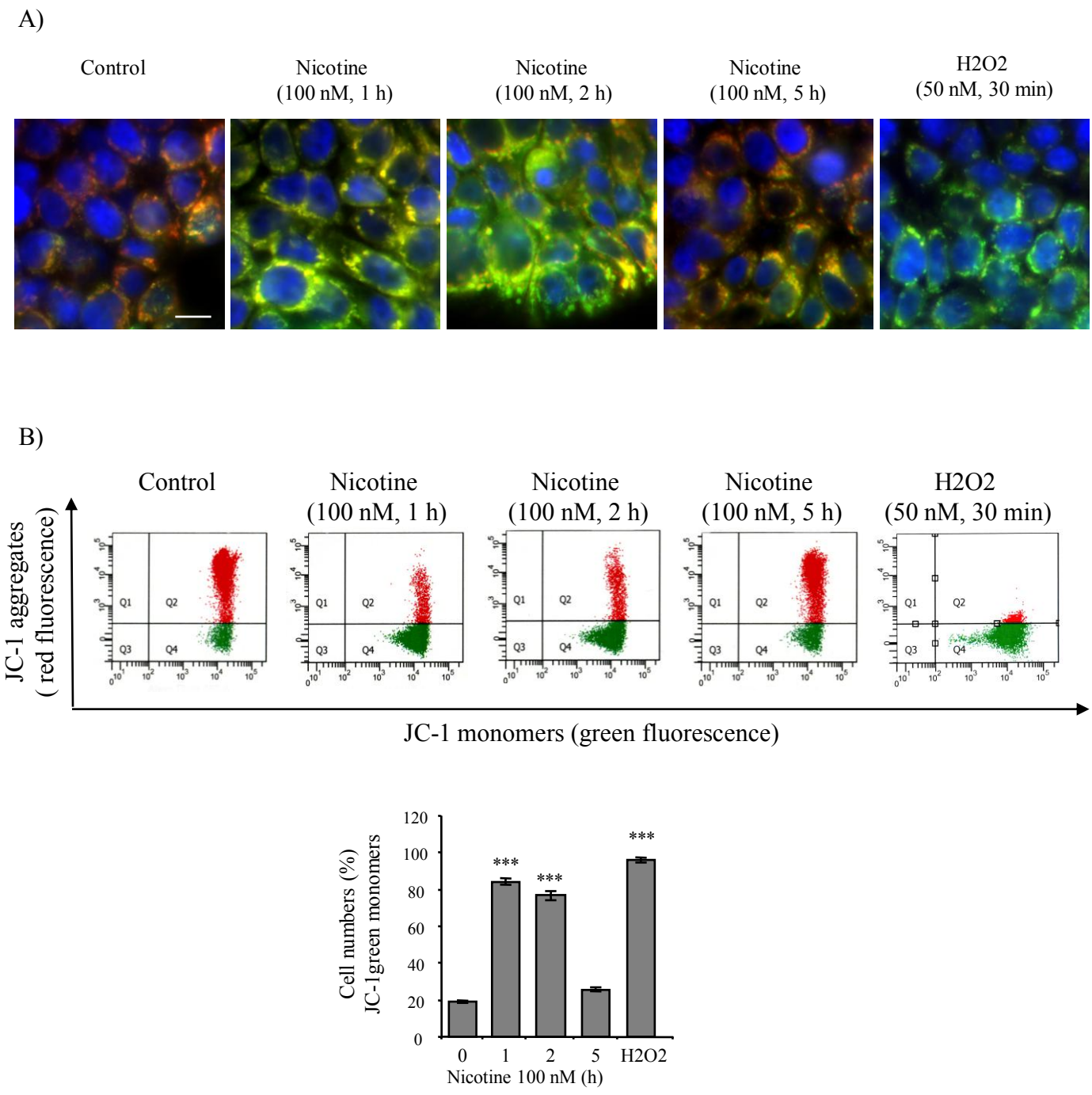


Figure 2:Nicotine stimulation provokes mitochondrial dysfunction.
Effects of nicotine on mitochondrial membrane potential were analysed by fluorescence microscopy (A) or by flow cytometry (B). Cells were treated with nicotine (100 nM) for the indicated times. H_2O_2 was used as a positive control. Intact mitochondrial membrane potential was visualised by JC-1 aggregates (red) and mitochondrial membrane potential depolarization was observed by JC-1 monomers (green). For microscopy analysis, scale bar, 20 µm. Histograms representing the % of cells with mitochondrial membrane depolarization (JC-1 green monomers) were createdusingflow cytometry data. Nicotine induced a transient changein the mitochondrial membrane potential of HT-29 cells. *** p< 0,001 vs. untreated cells (0 h).

appeared with red fluorescence whereas nicotine-treated cells showed a majority of green cells due to low Δψm. Nicotine-induced mitochondrial depolarization was time-dependent with a maximum appearing after two hours of treatment and a return toward control cell levels at 5 hours. H_2O_2 exposition (50 nM, 30 min) has been used as a positive control.Under these conditions, all cells exhibited green JC1. These results were further quantified by FACS analysis (Figure 2B). The cells were stained with JC1 and the percentage of cells with green-positive and red-negative fluorescence was scored as depolarized cells. The number of cells with depolarized mitochondrial membranes was found to increase in nicotine-treated cells from 18.73% in control cells to 84.20% and 76.70% after one and two hours of exposure to nicotine, respectively. Nicotine effects on Δψm disruption were transitory since after 5 hours of nicotine treatment, the percentage of depolarized cells returned to that of the control cells (25.60%). As expected, H_2O_2 exposition (50 nM, 30 min) induced Δψm disruption in 96% of HT-29 cells.These observations confirm that nicotine alters the mitochondria functions by inducing the disruption of membrane potential and the production of ROS.

Nicotine induces the endoplasmic reticulum stress response in HT-29 cells

Stresses that alter ER functions cause the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen, a condition referred to as ER stress [47]. To cope with ER stress, cells activate a protein quality control mechanism known as unfolded protein response (UPR) that up-regulates several ER chaperones, such as GRP78/BIP (78-kDa glucose regulated protein), or heat shock proteins (HSPs) [48]. The involvement of ER stress signalling in the response triggered by nicotine was evaluated by measuring the protein expression levels and the cellular distribution of GRP78/BIP and HSP70 after nicotine treatment using western blot analysis (Figure 3). The time course results indicated that the expression of GRP78/BIP and HSP70 were up regulated following treatment with 100 nM nicotine from 1 to 24 h (Figures 3A and B). In addition, as shown in Figure 3C, nicotine also affected the subcellular distribution of GRP78. In control cells, GRP78/BIP was principally localized in the ER and slightly in lysosomes- and nucleus-enriched fractions. After nicotine treatment, GRP78/BIP was still strongly expressed in the ER but was absent in lysosomes and diffused in cytosol- and endosomes-enriched fractions. In contrast, HSP70 protein was expressed in the entire subcellular fraction studied and nicotine treatment did not modify its localization but only increased its expression, particularly in ER-, cytosol- and lysosomes-enriched fractions (Figure 3D).These results indicate that nicotine induces various cellular stresses such as mitochondrial and ER stresses that can regulate autophagy.

Nicotine induces autophagy in HT-29 cells

The interplay between autophagy and nicotine-induced cellular stresses was first analyzed using western blot by the endogenous LC3 conversion from LC3-I to LC3-II, a microtubule-associated protein that is lipidated upon activation of autophagy [49]. As shown in Figure 4A, the ratio of LC3-II to LC3-I in HT-29 cells gradually increased in a time-dependent manner with nicotine treatment (Figure 4A). In addition to biochemical assay, the expression of Beclin 1 and ATG7 at the mRNA levels were examined by RT-PCR. Atg7 is reported to be a core regulator of autophagy, which is required for membrane trafficking, whereas Beclin 1 is a component of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) complex required in the initial step of autophagosome assembly [50]. As shown in Figure 4B, Beclin 1 and ATG7 mRNA levels increased after 2 hof nicotine treatment, and then decreased to control levels after 24 h. The formation of punctuate dots with EGFP-LC3 fusion protein is a well-characterized approach for visualizing autophagosomes [51]. To further confirm that nicotine induces autophagy in HT-29 cells, we used a HT-29 cell line stably transfected with a

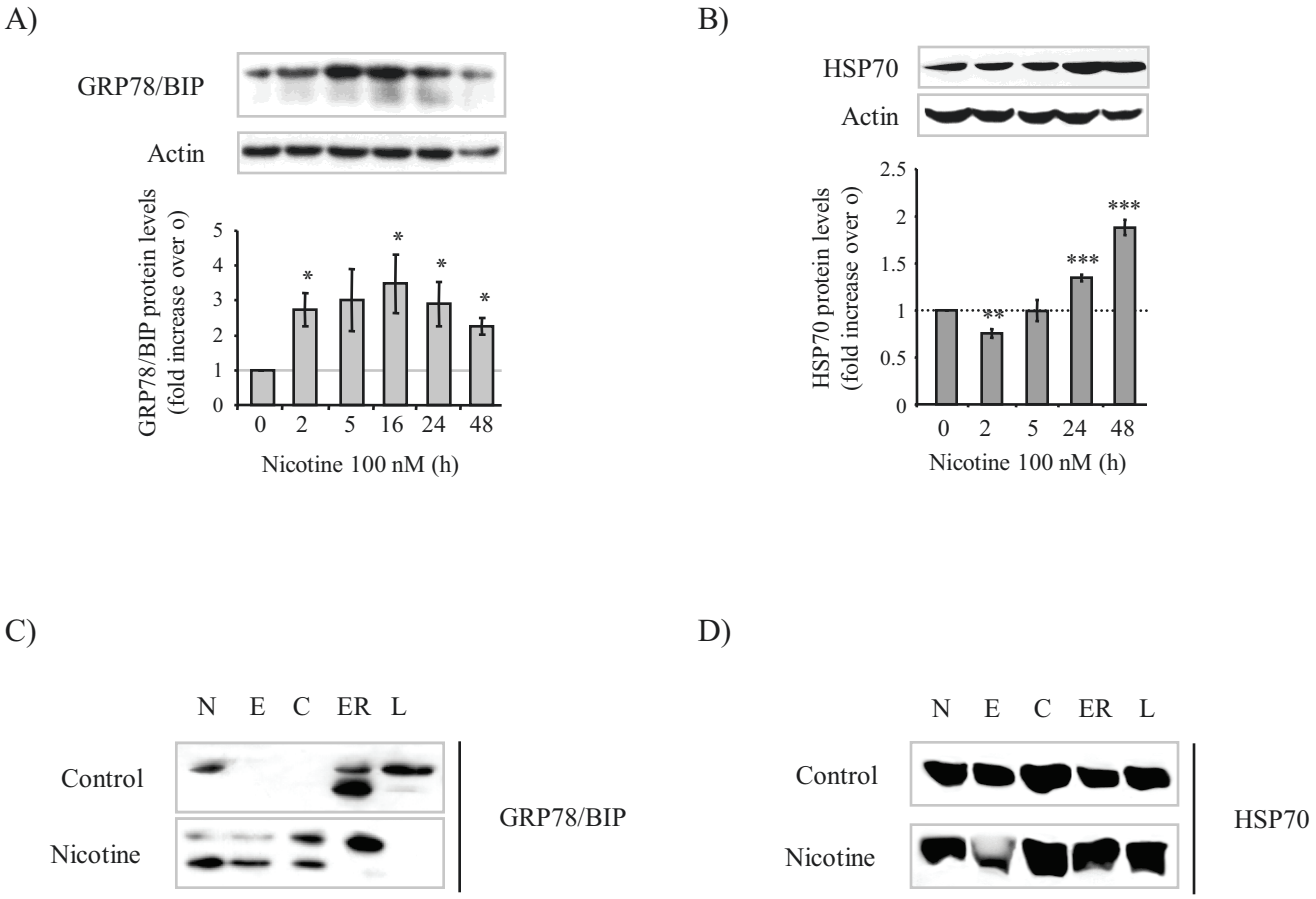


Figure 3:Nicotine induces an endoplasmic reticulum stress. HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) between 0 and 48 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for Western blot analysis to measure the relative expression of GRP78/BIP (A) or HSP70 (B). Actin was used as an internal loading control. Data represents means ± SD. *p < 0,05 vs. untreated cells. **p< 0,01 vs. untreated cells, *** p < 0,001 vs. untreated cells. C and D) HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) for 2 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for cell fractionation to observe GRP78/BIP (C) or HSP70 (D) localization. N: nuclear fraction, E: endosomes-enriched fractions, C: cytosolic fractions, ER: reticulum endoplasmic–enriched fractions, L: lysosomes and mitochondrial-enriched fractions.

EGFP-LC3 plasmid treated with nicotine for 5 h and 24 h. Microscopic examinations showed the characteristic punctuate fluorescent pattern of EGFP-LC3, indicating autophagosome formation and the occurrence of autophagy (Figure 4C). The quantitative data for EGFP-LC3 indicated that nicotine increased both the percentage of positive cells for EGFP-LC3 and the formation of EGP-LC3 dots per cell.As mitochondrial functions were altered following nicotine treatment, we explored specifically the possibility of the activation of mitophagy by staining EGFP-LC3-overexpressing HT-29 cells with Mitotracker Red Dye (Figure 4D). We found that a portion of the nicotine-induced autophagy is mitophagy since some of the green light punctuatefrom EGFP-LC3 and red light punctuates from mitotracker had been co-located, as it was observed under a confocal microscopy. This was seen during the first 30 min of treatment with nicotine. All these results demonstrate that nicotine increased autophagosome formation and induced autophagy and in particular mitophagy.

Nicotine induces Cox-2 expression and the release of PGE_2

The underlying molecular mechanisms responsible for nicotine-induced autophagy are still unknown. However this process is associated with cellular stresses, ROS production and alteration in Ca^{2+} homeostasis. Both ROS and Ca^{2+}have been shown tostimulate Cox-2 expression[52,53]. We thus examined the effect of nicotine on Cox-2 expression at the protein level in HT-29 cells by western blotting. The exposure of HT-29 cells to nicotine resulted in the induction of Cox-2 protein expression (Figure 5A). The level of Cox-2 protein increased approximately 1.9 and 1.75 fold after exposure to 100 nM nicotine for 2 and 5h respectively. The levels for Cox-2 proteins were still higher but not significantly different than the control after longer exposure times to nicotine (from 12 to 48h). PGE_2 is the main product of Cox-2 activity. We therefore sought to determine whether induction of Cox-2 protein is associated with an increase in the production of PGE_2 by HT-29 cells. HT-29 cells were incubated with nicotine for the indicated period time (Figure 5B). Nicotine stimulation resulted in a 1.9 and 2.85fold increase in the intracellular PGE_2 concentration after 2h and 5h of treatment, respectively, whereas no detectable amount of PGE_2 was found in the culture medium for the same time intervalseven after nicotine treatment (data not shown). The Cox-2 specific inhibitor NS398 (10 μM, ON) completely inhibited basal and nicotine-induced PGE_2 production. This suggests that nicotine-stimulated intracellular production of PGE_2 is a result of Cox-2 expression.

To determine the signalling pathway associated with nicotine-induced Cox-2 expression, HT-29 cells were incubated with different pharmacological inhibitors for key regulatory pathways such as LY294002 for PI3-K, U0126 for MEK and H-89 for PKA/PKC inhibition. We found no effect of U0126 and H-89 on nicotine-induced Cox-2 protein expression (data not shown). In contrast, nicotine-induced Cox-2 protein expression was down regulated significantly by LY29402 after 2h and 5hof treatment with nicotine suggesting that nicotine-induced Cox-2 expression is involved in PI3-K signalling (Figure 5C). As a control, NS398 treatment did not significantly affect the level of Cox-2 protein in HT-29 cells indicating that the inhibition of PGE_2 production observed in these conditions was not associated with lower levels of Cox-2 protein.

Cox-2 and PGE_2 production are involved in Nicotine-induced autophagy in HT-29 cells

We further investigated the role of Cox-2 mediated PGE_2 production in the nicotine-induced autophagy shown earlier. First, we examined the levels of autophagy in HT-29 cells transfected with the EGFP-LC3 plasmid by observing the EGFP-LC3 fluorescencepattern. As shown in Figure 6A, pre-treatment with NS398 and LY294002 abrogated the formation of EGFP-LC3 punctuates induced by nicotine whereas the MEK inhibitor had no effect (U0126). This suggests that Cox-2 expression and activity were necessary for nicotine-induced

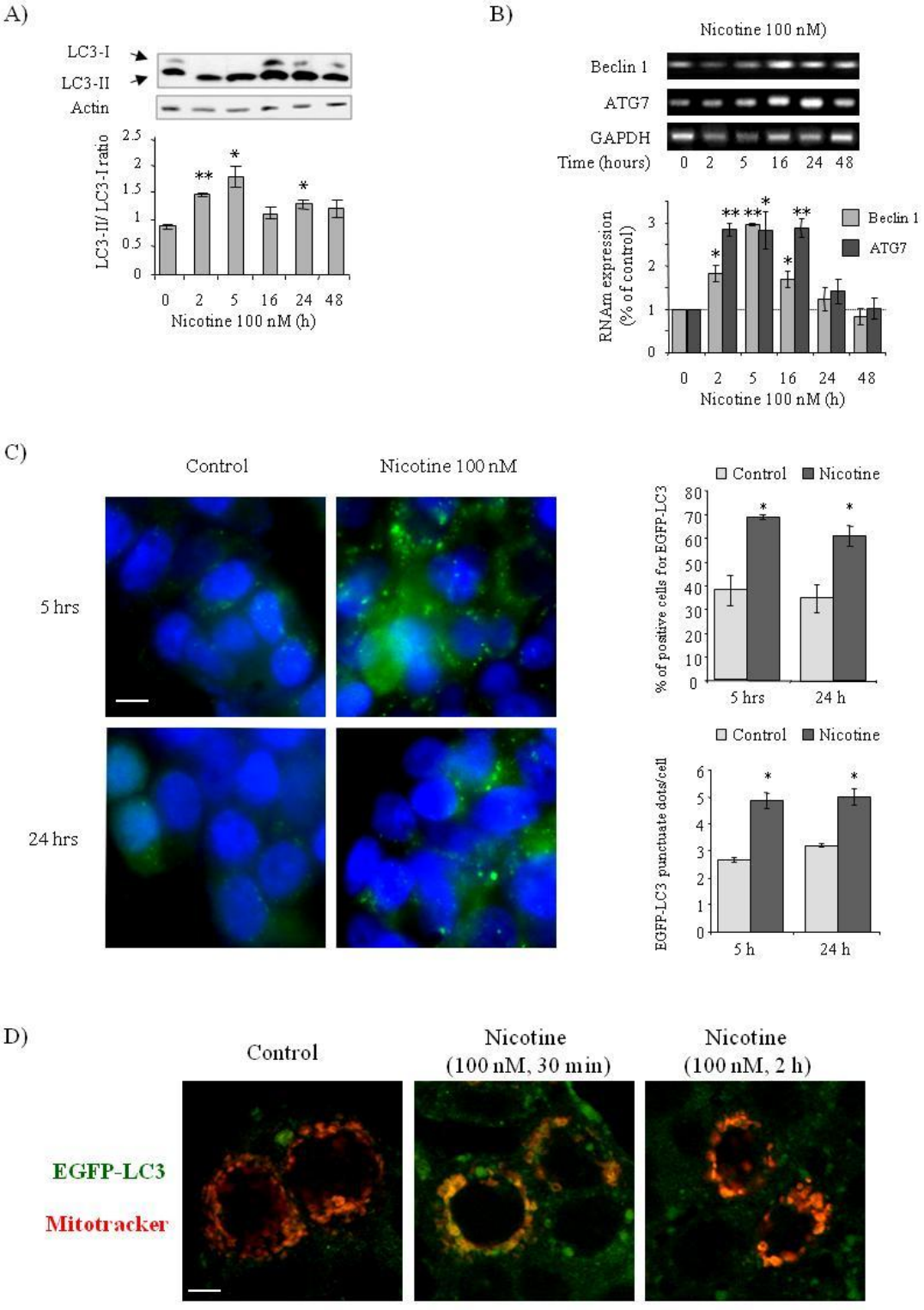


Figure 4: Nicotine induces autophagy/ mitophagy.

A) *Nicotine increases autophagy's protein expression*. HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) between 2 and 48 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for Western blot analysis to measure the conversion from LC3-I to LC3-II. The conversion from LC3-I to LC3-II is indicative of the onset of autophagy. Actin was used as an internal loading control. Data represents means ± SD. *p< 0,05 vs. untreated cells (0 h), **p < 0,01 vs. untreated cells (0 h). B) *Nicotine increases autophagy's genes transcription.* HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) between 0 and 48 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for RT-PCR analysis to measure the relative expression of Beclin 1 and ATG7 RNAm. GAPDH was used as a housekeeping gene. Data represents means ± SD. *p < 0,05 vs. untreated cells (0 hr), **p < 0,01 vs. untreated cells (0 hr). C) *Nicotine increases LC3 punctate dots*. HT-29 EGFP-LC3 cells were treated with nicotine (100 nM, 5 and 24 h) to quantify thedistribution of EGFP-LC3 punctate dots by epifluorescence microscopy analysis. The punctate dots were counted in a blind manner. Nicotine stimulation increases the percentage of positive cells for EGFP-LC3 and EGFP-LC3 punctate dots per cell. Data represents means ± SD. * p < 0,05 vs. control. Scale bar, 20 µm D) *Nicotine induces an early mitophagy*. HT-29 EGFP-LC3 cells were incubated overnight with the mitotrcker probe and then treated with (or without) nicotine (100nM) for the indicated times. Mitophagy was observed by co-localization (yellow/orange) between mitotracker (red) and GFP-LC3 (green) by confocal microscopy. Scale bar, 20 µm.

autophagy. We then studied the direct effect of PGE_2 on autophagy in HT-29 cells (Figure 6B and 6C). In the presence of PGE_2, the ratio of LC3-II to LC3-I conversion rapidly increased (under 30 min) and was stable for two hours (Figure 6B). Also, the fluorescence of EGFP-LC3 punctuates gradually increased in a time-dependent manner with PGE_2 (Figure 6C). Altogether, these results indicate that nicotine-induced autophagy is mediated by the production of PGE_2 in a Cox-2-dependent manner. The role of PGE_2 as a mediator of nicotine signalling on HT-29 cell survival was therefore studied.

PGE_2 a key mediator of nicotine signalling on HT-29 cell survival

On one hand, cellular stresses have been associated with apoptosis and on the other, PGE_2 has been shown to exert divergent effects on cell survival. Thus, we explored the crosstalk between apoptosis and cell survival in nicotine treated HT-29 cells. First, we investigated the caspase dependent pathway by analysing protein expression in HT-29 cells exposedto nicotine. The activation of the ER resident caspase-12 was analysed by western blot (Figure 7A). The level of the pro-caspase-12/caspase-12 ratio increased in a time-dependent manner with nicotine treatment. While the maximum level of pro-caspase-12 wasfoundbetween 2 h and 5 h of treatment with nicotine, the expression levels of the active form of caspase-12 were maximized between 16 to 24 h of nicotine treatment then returning to control-level values at 48 h. Since caspase-3 is an executioner of apoptosis induced by a variety of stimuli, the expression of cleaved caspase-3 (active caspase) was also investigated in the study. In a similar pattern of caspase-12, active caspase-3 expression was also elevated in a time-dependent manner after nicotine treatment (Figure 7B). The role of nicotine-induced alteration of mitochondria in caspase-3 activation was investigated by analysing the release of cytochrom c from HT-29 cells treated or not with nicotine (Figure 7D). Nicotine induced the release of cytochrom c from the mitochondria into the cytoplasm in a time-dependant manner with a maximum at 24 h. These data were compiled using functional fluorimetric tests measuring caspase-3 activities with an enzyme specific substrate, z-DEVD pNA (Figure 7C). The specificity of the reaction has been verified using a specific caspase-3 inhibitor, z-VAD as specified in the kit. In preliminary experiments we determined that the caspase-3 activity was dose and time-dependent with a maximum found after 24 hof exposure ofHT-29 cells to nicotine. As shown in Figure 7C, within 24 h, nicotine (100 nM) triggered an approximately 49% increase in caspase-3 activity compared to control HT-29 cells. This effect was abolished by the addition of PI3-K (LY294002) or Cox-2 (NS398) inhibitors.Flow cytometry results further confirmed the apoptotic effects of nicotine on HT-29 cells. As shown in Table 2, the percentage of apoptotic cells which are annexin V (+)/ PI (-) cells increased from 8.7% to 27.9% and 22.4% after 2 h and 5 h of nicotine treatment, respectively. However, pre-treatment with NS398 before nicotine significantly attenuated the percentage of apoptotic cells to 17.3% at 2 h and 9.8% at 5 h (a value similar to the percentage of apoptotic cells in control cells). These observations suggest that nicotine-induced cellular stresses initiate caspase-dependent apoptosis in HT-29 cells, an effect associated with PGE_2 production.

In colorectal cancer cells, PGE_2 has also been reported to promote cell growth [54].According to these divergent effects, we investigated the effectsof nicotine on cell viability. Figure 7D indicates that nicotine treatment induced a slight but significant increase in HT-29 cells as measured by an MTT assay. The effect of nicotine was maximized at 48 h (a 1.4 fold increase). At 72 h, total cell number decreased due to confluence. The blockade of PI3-K and Cox-2 pathways abolished the nicotine-mediated cell survival. After 72 h, the Cox-2 inhibitor, NS398 also exerted an inhibitory effect onthe untreated HT-29 cells suggesting that basal production of PGE_2 was necessary for long-term cell survival.

Together all these data indicate that nicotine-induced ER stress leads to apoptosis in HT-29 cells mediated by caspase-12, but also through mitochondria-dependent pathways that

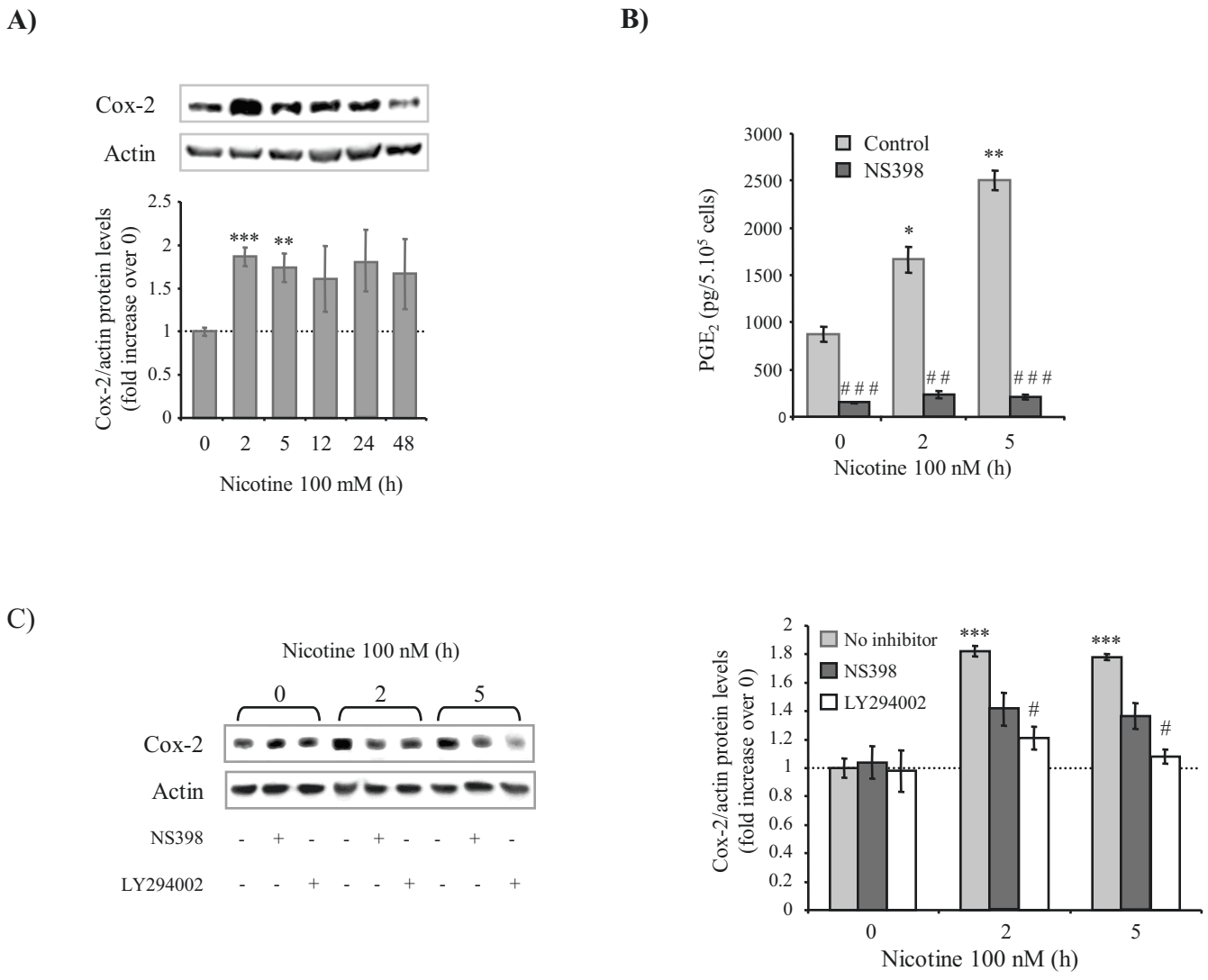


Figure 5:Nicotine up-regulates Cox-2 expression and prostaglandin E2 (PGE_2) production. A) *Nicotine induces Cox-2 expression*. HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) between 0 and 48 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for Western blot analysis to measure the expression of Cox-2 protein. Actin was used as an internal loading control. **p< 0,01 *vs.* untreated cells (0 h), ***p < 0,001 *vs.* untreated cells (0 h). B) *Nicotine induces PGE_2production*. HT-29 cells were pre-treated with (or without) NS398 (10 µM, ON), an inhibitor of Cox-2, and incubated with (or without) nicotine (100 nM) between 0 and 5 h. PGE_2 synthesis was assessed in cell lysates using PGE_2 ELISA kit as described in materials and methods section. Data represents means ± S.E. *p < 0,05 *vs.* control 0 h, **p < 0,01 *vs.* control 0 h, ***p < 0,001 vs. control 0 h. # p < 0,05 vs. nicotine at the same time, ## p< 0,01 *vs.* nicotine at the same time, ### p < 0,001 *vs.* nicotine at the same time.C) *Nicotine induced Cox-2 expression by PI3-K signalling.* HT-29 cells were pre-treated with (or without) NS398 (10 µM, ON), a Cox-2 inhibitor, or LY294002 (25 µM, 1 h), a PI3-K inhibitor,and incubated with nicotine (100 nM, 0, 2 and 5 h) to quantify the level of Cox-2 protein by western blot analysis. Data represents means ± SD. ***p < 0,001 vs. untreated cells (no inhibitor 0 h), # p < 0,05 *vs.* treated cells at the same time.

rely on cytochrom *c* release and activation of caspase-3. These apoptotic effects are counter balanced by increased cell proliferation since treatment with nicotine slightly increases cell viability. The signalling pathway common to this balance involved PGE_2 production.

DISCUSSION

The present study was conducted to elucidate the molecular basis for the nicotine-induced autophagy in the HT-29 cell model. We show that nicotine induced I) cellular stresses corresponding to mitochondrial dysfunction associated with ROS production and ER stress, and the resulting caspase pathway activation; II) autophagy /mitophagy mechanism; III) Cox-2 expression and PGE_2 production probably in response to calcium signalization following α7nAChR activation. By regulating autophagy and cell survival, PGE2 appears to be a key mediator of nicotine effects (Figure 8). This mechanism may explain the protective effect of nicotine on IBD patients.

Nicotine, an inducer of Cox-2 expression and PGE_2 production

Nicotine-induced Cox-2 expression has been demonstrated in human gingival fibroblasts and in gastric cancer cells[55,56]. Our study indicates that nicotine also up-regulates Cox-2 expression and PGE_2 production in HT-29 colon carcinoma cells and that this effect is mediated by α7nAChR. Similar results were obtained after stimulation of the muscarinic receptors (mAChR) by carbacol, indicating that cholinergic receptor stimulation is involved in the regulation of Cox-2 expression [57].It has been recently demonstrated that in colon cancer cells, Cox-2 expression is mediated by the activation of nuclear factor kappa B (NF-κB) [58,59]. In addition, NF-κB binding sites have been identified in the promoter region of Cox-2 gene [60]. We thus speculate that nicotine induces Cox-2 up-regulation through NF-κB activation. Western blot and immunofluorescence analysis indicated that in HY-29 cells nicotine did not induce iκB degradation, nor nuclear translocation of NF-κB. Using HT-29 cells transfected with pNK-kB-Luc plasmids, we did not observe any increase in luciferase activity upon nicotine stimulation (data not shown). Our data rather suggest that the oxidant effects of nicotine mediate the induction of Cox-2 in HT-29 cells, a finding consistent with previous reports that oxidative stress can induce Cox-2 [61–63]. In Barrett's cells, NOX-5 over-expression significantly increased H_2O_2 production, Cox-2 expression, PGE_2 production and cell proliferation [53]. The signalling pathway and the following effects will depend on the nature of the ROS and their dose. It is known that low doses of H_2O_2 are mitogenic and promote cell proliferation, intermediate doses result in growth arrest, and high doses cause cell death via either an apoptotic or necrotic mechanism (reviewed in [64]). In our system, nicotine rather induces mitochondrial superoxide anion (O_2^-) production since we did not observed increase in fluorescence with the DA-DCF probe. ROS production is associated with mitochondrial depolarization.

Finally, nicotine-induced intracellular mobilization of Ca^{2+} *via* α7nAChRmay also enhance Cox-2 expression and PGE_2 production in our system as it was observed for osteoblasts and for kidney mTAL cells [52]. The increased intracellular calcium can mediate the transcriptional transactivation of members of the cAMP response element (CRE) and activator protein-1 (AP-1) families [65,66]. Indeed, the 371bp region of Cox-2 promoter contains multiple potential cis acting sites including CRE and AP-1 binding sites [67,68]. Different signalling cascades including PKA, PKC and ERK have been associated with this effect [52,69,70].Further experiments will be necessary to determine the signalling pathway involved in nicotine-induced Cox-2 regulation. We found no effect of U0126 (MERK inhibitor) and H-89 (PHA/PKC inhibitors) on nicotine-induced Cox-2 protein expression (data not shown).

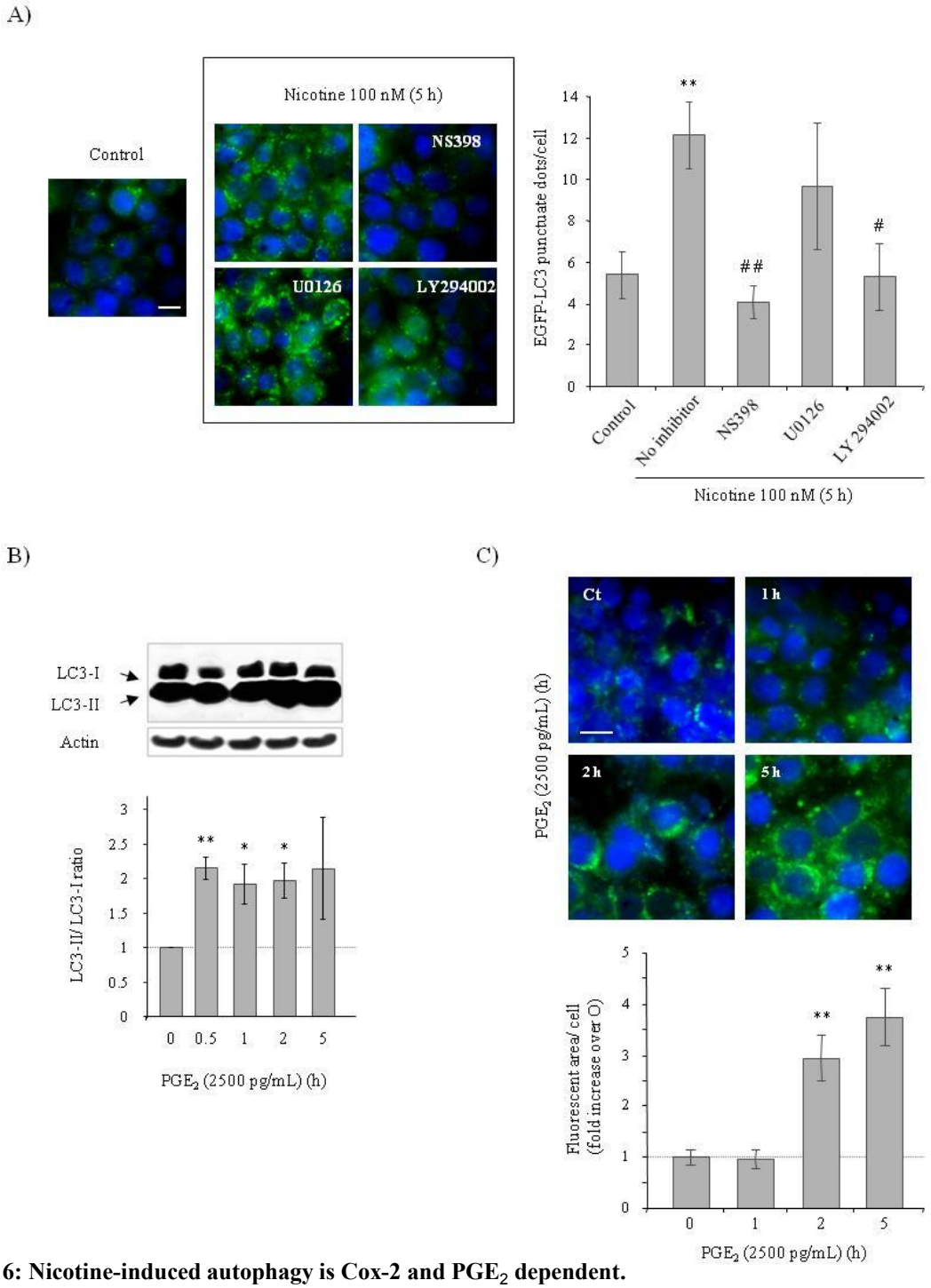


Figure 6: Nicotine-induced autophagy is Cox-2 and PGE_2 dependent.

A) *Nicotine-induced autophagy is Cox-2 and PI3-K dependent.* HT-29 EGFP-LC3 cells were pre-treated with (or without) NS398 (10 µM, ON), a Cox-2 inhibitor, or U0126 (25 µM, 1 h), a MEK inhibitor or LY294002 (25 µM, 1 h), a PI3-K inhibitor. Then, HT-29 EFGP-LC3 cells were treated with nicotine (100 nM, 5 h) to quantify the distribution of EGFP-LC3 punctuate dots by epifluorescence microscopy analysis. The punctuate dots were counted in a blind manner. Data represents means ± SD. ** $p < 0,01$ *vs.* control, # $p< 0,005$*vs.*no inhibitor (nicotine 5 h), ## $p< 0,01$ *vs.* no inhibitor (nicotine 5 h). Scale bar, 20 µm. B) *Autophagy' protein expression is induced by PGE_2.* HT-29 cells were treated with (or without) PGE2 (2500 pg/ml) between 0 and 5 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for Western blot analysis to measure the conversion from LC3-I to LC3-II. The conversion from LC3-I to LC3-II is an indicator of the onset of autophagy. Actin was used as an internal loading control. Data represents means ± S.E. *$p< 0,05$ *vs.* untreated cells (0 h), **$p < 0,01$ *vs.* untreated cells (0 h). C) *PGE_2 induces autophagy.* HT-29 EGFP-LC3 cells were treated with (or without) PGE_2 (2500 pg/mL) between 0 and 5 h. Quantification and distribution of EGFP-LC3 punctuate dots were determined by epifluorescence microscopy analysis. The punctuate dots were counted in a blind manner. Data represents means ± SD. ** $p < 0,01$ *vs.* untreated cells (0 h). Scale bar, 20 µm.

Ambiguous properties exhibited by PGE_2

Ample evidences both *in vivo* and *in vitro* have reported that Cox-2 is closely associated with carcinogenesis suggesting that a cholinergic activation pathway has a role in the pathogenesis of colon cancer. Experimental evidencesuggests that Cox-2 and its metabolites, PGE_2, affect the regulatory mechanisms controlling cell survival, proliferation, migration, invasion and the interactions with neighbouring cells and stroma (for review [37]). The regulation of Cox-2 expression is inversely correlated to the differentiation status of colon cancer cells. This effect could be associated with the IGF-II/IGF-Ir pathway that has been demonstrated to up-regulate Cox-2 mRNA expression and PGE_2 synthesis in Caco-2 cells, a process inhibited by the blockade of PI3-K [71]. Our data are in agreement with this observation since pre-incubation of HT-29 cells with LY294002 also inhibited nicotine-induced Cox-2 expression. The mechanism of nicotine-mediated increase in cell proliferation is not known. We hypothesize that an increase in cell proliferation may partially depend on Cox-2–derived PGE_2 production. PGE_2 induces the activation of several pathways in cancer cells through its interaction with membrane prostanoid receptors (EP) subdivided into four mean subtypes (EP1-4), and nuclear receptors (PPARδ) thereby promoting proliferation and survival [37,72]. Also, PGE_2 dependent pro-oncogenic actions have been demonstrated through EP2 and EP4 activation and cAMP increase [73,74]. Up-regulation of EP4 occurs during human colorectal tumorigenesis *in vivo* and genetic or pharmacological inactivation of EP4 inhibits tumour growth in a mouse model of intestinal neoplasia [75,76]. However, PGE_2 was also shown to exert contrary effects on colon cancer cell proliferation through different signalling pathways depending on the range of its concentration in the cell culture [77]. In particular, Lalier et al., showed that an increase in intracellular PGE_2 induces apoptosis in colon cancer cell [78]. It therefore appeared that not only concentration but also the site of production of PGE_2 might need to be taken into account. Li and colleagues recently described an attractive emerging concept concerning the dual role of PGE_2 on both cell proliferation and apoptotic cell death [79]. They proposed that during the wound healing process: newly intracellular PGE_2sensitive the cells to death through the activation of the apoptotic protein Bax and caspase pathway; then in injured cells caspase activation is responsible for PGE_2 synthesis and release. At the wound site, released PGE_2 stimulates stem cell proliferation and tissue regeneration. In our system, PGE_2 activity would follow a two-step mechanism: first, nicotine-mediated intracellular PGE_2 participates in apoptotic cell death together with nicotine-mediated cellular stresses; second, released PGE_2 from apoptotic cells has an autocrine, paracrine protective or stimulating activity on the neighbouring cells or the producing cells through EP receptors. This concept may explain some conflicting data observed between extracellular PGE_2 treatments which promotes colorectal adenoma growth and modulation of PGE_2 production that protect from intestinal tumorigenesis in $APC^{(Min/+)}$ mice [72,80].

Nicotine–induced autophagy: a selective protective mechanism

Multiple stimuli, induced or followed by ROS production, can trigger both ER stress and autophagy [46,81]. Increased ROS is considered to function as either a stressor or intermediate signalling stimulus/messenger between ER stress and mitochondria [82]. We have shown that nicotine was able to induce various cellular stresses such as mitochondrial and ER stresses characterized by the increased expression of GRP78/BIP and HSP70 protein levels. These cellular stresses may contributeto autophagy/mitophagy in response to nicotine-induced mitochondrial ROS production that is associated with disturbance of the mitochondrial membrane potential. Yuzefovych et al., recently showed that mitochondrial dysfunction and oxidative stresses are associated with ER stress, autophagy and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance in mice [83]. In this study we found that several pro-

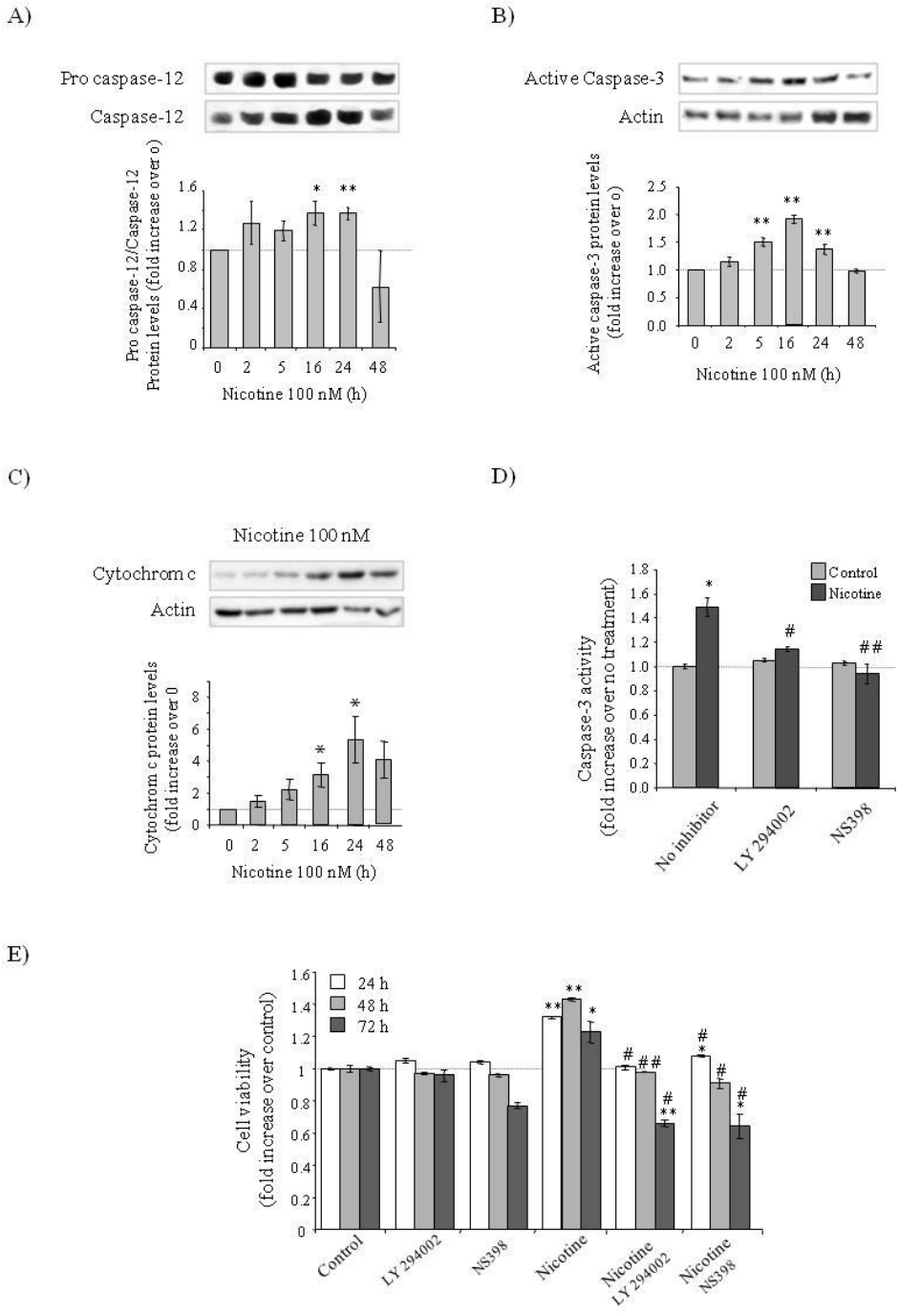


Figure 7:Nicotine regulates both apoptotic and proliferative signals.
Nicotine induces caspase pathways. HT-29 cells were treated with (or without) nicotine (100 nM) between 0 and 48 h. Cells were harvested, lysed, and prepared for Western blot analysis to measure the relative protein expression levels of pro-caspase-12 and caspase-12 (A), active caspase-3 (B), and cytochrom c release (C). Actin was used as an internal loading control. The conversion from pro-caspase-12 to caspase-12 is indicative of apoptose-induced ER stress. Data represents means ± SD. *p < 0,05 *vs.* control 0 h, **p < 0,01 *vs.* control 0 h. D) *Nicotine induced caspase-3 activation via Cox-2 and PI3-K signalling*. HT-29 cells were pre-treated with (or without) NS398 (10 µM, ON), a Cox-2 inhibitor or LY294002 (25 µM, 1 h), a PI3-K inhibitorand incubated with nicotine (100 nM, 24 h) to assessthe caspase-3's activity. Data represents means ± SD. * p < 0,05 *vs.* no inhibitor-control, # p< 0.05 *vs.* no inhibitor-nicotine, ## p< 0.01 *vs.* no inhibitor-nicotine. *E) Nicotine induces cell proliferation via Cox-2 and PI3-K signalling.* The test compounds (nicotine 100 nM, LY294002 25 µM, NS398 10 µM) were added for 24 h, 48 h, and 72 h of incubation before the cell proliferation assay. Untreated cells were used as a control. Data represents means ± SD. *p < 0,05 *vs.* control for time-t, **p < 0,01 *vs.* control for the same time, # p < 0,05 *vs.*nicotine for the same time, ## p< 0,01 *vs.* nicotine for the same time.

apoptotic pathways including caspases-3 and caspases-12 were activated by nicotine in HT-29 cells. Likewise annexin V staining is increased. Caspase-12 is located in the ER membrane and participates in apoptosis under ER stress via cleavage of pro-caspase-3 into activated caspase-3 [84,85]. Following α7nAchR activation, nicotine rapidly increases the cytosolic concentration of Ca2+, which may also contribute to nicotine-induced apoptosis and autophagy. Indeed it has been described in various models that increase in free cytosolc Ca2+ may participate in both pro-apoptotic signals [86] and autophagy, presumably by activating calmodulin-dependent kinase-B and inositol (1,4,5) triphosphate (IP3)-mediated calcium signalling [87,88]. It thus appeared that several signal transduction pathways that are triggered by common cellular stress could elicit both autophagy and apoptosis suggesting the existence of a crosstalk between these two processes (for review [89]). In particular cross-inhibitory interactions at the ER have been described in association with precise molecular events. For example, the autophagy-inducing activity of beclin-1 is inhibited by interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-2 when it is present in the ER [90].

A first indication of a relation between ER-stress and intestinal inflammation was provided by a study from 2001 that revealed an increased susceptibility to DSS-induced colitis in mice deficient in the ER-stress transducer IRE1β[91]. More recently ER stress was reported to play a key role in patients both with UC and CD after the discovery of single-nucleotide polymorphisms within the XBP1 gene encoding transcription factor XBP1, an essential component of the ER stress response [92,93] and up-regulation of CHOP and GRP78 in inflamed intestine in IBD [94]. Furthermore, four genes associated with autophagy in humans have been confirmed as CD but not UC susceptibility genes,namely: autophagy 16 like 1 (ATG16L1), immunity-related GTPase family M (IRMG), leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) and unc-51 like kinase 1 (ULK1). Levels of ATG16L1, IRGM or LC3B-II are significantly decreased in the intestinal tissue of CD patients when compared to non IBD-control patients [95]. The resulting dysfunction of autophagy has been well demonstrated, manifesting itself as defective handling of intracellular bacteria and typically resulting inchronic inflammation. Recently, autophagy has been proposed as a new target for the treatment of CD (for review [96]). We propose a new mechanistic explanation for the differences observed between UC and CD patients in response to nicotine. We hypothesized that nicotine exerts its protective role on UC patients by stimulating autophagy. In contrast, in CD patients, according to genetic alterations, nicotine is unable to induce autophagy and furthermore produces inflammation. Autophagy is thus proposed to prevent tumorigenesis by limiting necrosis, inflammation and inducing cell arrest and preventing genome stability [97,98].

From inflammation to cancer: the dual role of nicotine

Inlong-term, according to the persistence of inflammation, IBD increases risk of developing other chronic immune disorders and pathologies such as colitis associated cancer (CAC) [99]. The increase in prevalence of CAC in IBD patients depends on many factors such as efficacy of IBD management, disease severity and duration [100]. UC increases the cumulative risk of CAC by up to 18–20 % after 30 years of active disease.Epidemiological studies report that the long-term administration of anti-inflammatory drugs decreases the risk of colon carcinoma [101]. Moreover, both selective and non-selective Cox inhibitors were shown to effectively reduce both the incidence and progression of intestinal tumours in animal models of cancer but also in human cancer patients (reviewed in [102]). Last decade, according to its anti-inflammatory potential on immune cells, the activation of the cholinergic system and has been proposed as a new strategy for treating IBD patients [103]. In experimental models of inflammatory disease, vagus nerve stimulation (VNS) attenuates the production of pro-inflammatory cytokines and inhibits the inflammatory process [104–106].

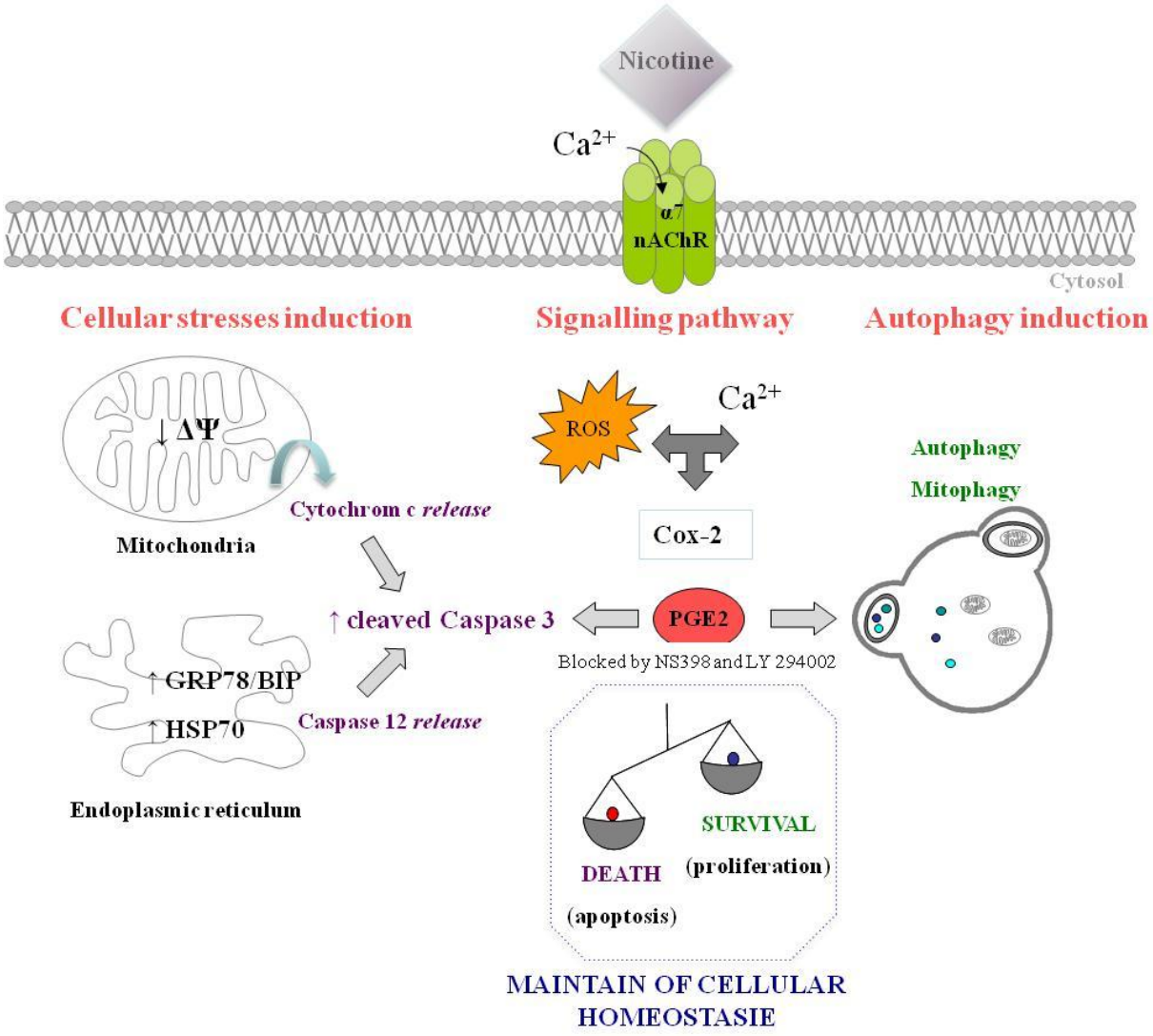


Figure 8: ***An integrated depiction of the results from the current study that show the role of nicotine in the regulation of cell homeostasis.*** α7nAChR stimulation by nicotine induces a rapid increase in cytosolic Ca^{2+} uptake. This signalling is associated with mitochondrial ROS production and induction of mitochondrial and ER stresses. In parallel nicotine induces Cox-2 up regulation and PGE_2 production that participate in the control of cell homeostasis by regulating apoptosis, cell proliferation and autophagy. These effects are in part associated withPI3-K signalling.

This effect is mediated by the release of ACh, which activatesα7nAChR expressed in macrophages [107]. However, epithelial cells also express mAChRand those expressions are increased in cancer cells [25,108]. mAChRis considered as a strong intestinal tumour promoter by modulating key processes of carcinogenesis [109]. Using HT-29 and Caco-2 cell lines, we demonstrated that ACh-induced activation of mAChR results in the modulation of cell adhesion propertiesthat correlate with the acquisition of invasive potential [26]. Using different *in vivo* models, Raufman et al., showed that m3AChR gene ablation decreases both colon tumour number, size and the degree of dysplasia [110,111]. In this context, the use of nicotine will be beneficial since: i) equimolar concentrations of nicotine were more efficient than ACh at inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages [25]; ii) Using a concentration similar to those observed in theblood of smokers (0.01 - 1 μM), we found that nicotine-mediated activation of α7nAChR exerts a protective effect on epithelial morphology and maintains barrier integrity[26]. McGilligan has described similar results, showing that nicotine decreases Caco-2 permeability by regulating the expression of tight junction proteins[112]. iii) nicotine induces protective autophagy and iv) nicotine is not degraded by cholinesterases and remainsnear its receptors for longer periods of time than ACh (reviewed in [3,113]). A number of clinical studies in which nicotine is administered to UC patients showed positive results on UC symptoms. These effects dependedon the mode of administration. For example, transdermal nicotine may be effective for UC, especially in ex-smokers, but its use is limited by its adverse effects. In contrast, clinical studies in which nicotine is applied directly to the colon indicated that UC symptoms are improved with only few side effects [114,115]. Similar findings with nicotine were reported in rodent models of colitis. For example, oral nicotine treatment improved the macroscopic damage of experimental colitis [14]. Nevertheless, results are conflicted by the side effects caused by the high systemic nicotine concentration needed [13,116,117]. Among these side effects are the fact that modulation of α7nAChR upon chronic exposition to tobacco may contribute to the development and progression of cancer. In lung and breast cancer cells it has been proposed that nicotine, acting via α7nAChR, stimulates mRNA and protein expression of fibronectin with a concomitant down regulation of junctional protein expression and/or localisation[118–120]. Evidence of nAChR-mediated activation of integrin-dependent signalling pathways has also been obtained in colon and gastric cancer [121]. Regarding the gastrointestinal tract, Cho"s laboratory showed that nicotine induced activation of α7nAChR and stimulated the growth and angiogenesis of gastric and colon cancer by systemic as well as cellular increases in stress neurotransmitters (adrenaline, noradrenaline) leading to β-adrenergic signalling, transactivation of the EGFR and release of EGF [122,123]. However the effects of nicotine could be modulated by α7nAChR endogenous agonist such as the secreted mammalian LY-6/urokinase plasminogen activator receptor-related protein-1 (SLURP-1), which exerts protective effect and anti tumor activity [124]. Its expression is downregulated by nicotine and inversely correlated with the expression of α7nAChR, which is in contrastup regulated by nicotine [125].

In summary, the present investigation indicates that nicotine regulates mitochondrial and ER stresses and induces autophagy in HT-29 cells. Nicotine appears to confer its effects via upregulation of Cox-2 and PGE2 production, which then controls cell survival (Figure 8). These findings explain in part why nicotine is a beneficial agent for improving intestinal mucosal cells survival in IBD patients, particularly those withUC. Further studies are required to determine the possibility that nicotine could be an effective chemotherapeutic agent for the management of IBD without inducing colon cancer.

Acknowledgements and declarations of interest

We thank Marie Leger and Anna Garnier for their excellent technical support. The authors disclose no conflicts.

Funding

The authors gratefully acknowledge grant support from Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer and the Université Joseph Fourier. Pelissier-Rota is the recipient of a fellowship from the Ministre de la Recherche et de l‟Enseignement Supérieur.

Author contributions

Marjolaine Pelissier-Rota and Muriel Jacquier-Sarlin designed and conducted the experiments, analysed and interpreted the results, and wrote this paper. Patrick Meresse conducted FACS experiments. Ludovic Pelosi contributed to data interpretation and revising of the paper.

REFERENCES

1 Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. and Rogers, S. W. (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol. Rev. **89**, 73–120.

2 Russo, P., Cardinale, A., Margaritora, S. and Cesario, A. (2012) Nicotinic receptor and tobacco-related cancer. Life Sci., Elsevier Inc. **91**, 1087–1092.

3 Cardinale, A., Nastrucci, C., Cesario, A. and Russo, P. (2012) Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. Crit. Rev. Toxicol. **42**, 68–89.

4 Lee, J. and Cooke, J. P. (2012) Nicotine and pathological angiogenesis. Life Sci. **91**, 1058–64.

5 Schaal, C. and Chellappan, S. P. (2014) Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. Mol. Cancer Res. **12**, 14–23.

6 Schuller, H. M. (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? Nat. Rev. Cancer **9**, 195–205.

7 Picciotto, M. R. and Zoli, M. (2008) Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer‟s and Parkinson's disease. Front. Biosci. **13**, 492–504.

8 Boyko, E. J., Koepsell, T. D., Perera, D. R. and Inui, T. S. (1987) Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. N. Engl. J. Med. **316**, 707–10.

9 Gheorghe, C., Pascu, O., Gheorghe, L., Iacob, R., Dumitru, E., Tantau, M., Vadan, R., Goldis, A., Balan, G., Iacob, S., et al. (2004) Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **16**, 1153–9.

10 Höie, O., Wolters, F., Riis, L., Aamodt, G., Solberg, C., Bernklev, T., Odes, S., Mouzas, I. A., Beltrami, M., Langholz, E., et al. (2007) Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. Am. J. Gastroenterol. **102**, 1692–701.

11 Mokbel, M., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Gendre, J. P. and Cosnes, J. (1998) [Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]. Gastroentérologie Clin. Biol. **22**, 858–62.

12 Van der Heide, F., Dijkstra, A., Weersma, R. K., Albersnagel, F. A., van der Logt, E. M. J., Faber, K. N., Sluiter, W. J., Kleibeuker, J. H. and Dijkstra, G. (2009) Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn‟s disease and ulcerative colitis. Inflamm. Bowel Dis. **15**, 1199–207.

13 Cosnes, J. (2004) Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **18**, 481–96.

14 Odes, H. S., Fich, A., Reif, S., Halak, A., Lavy, A., Keter, D., Eliakim, R., Paz, J., Broide, E., Niv, Y., et al. (2001) Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn"s disease and ulcerative colitis. Dig. Dis. Sci. **46**, 1717–21.

15 De Castella, H. (1982) Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). **284**, 1706.

16 Kuisma, J., Järvinen, H., Kahri, A. and Färkkilä, M. (2004) Factors associated with disease activity of pouchitis after surgery for ulcerative colitis. Scand. J. Gastroenterol. **39**, 544–8.

17 Motley, R. J., Rhodes, J., Ford, G. A., Wilkinson, S. P., Chesner, I. M., Asquith, P., Hellier, M. D. and Mayberry, J. F. (1987) Time relationships between cessation of smoking and onset of ulcerative colitis. Digestion **37**, 125–7.

18 Rudra, T., Motley, R. and Rhodes, J. (1989) Does smoking improve colitis? Scand. J. Gastroenterol. Suppl. **170**, 61–3; discussion 66–8.

19 Bergeron, V., Grondin, V., Rajca, S., Maubert, M.-A., Pigneur, B., Thomas, G., Trugnan, G., Beaugerie, L., Cosnes, J., Masliah, J., et al. (2012) Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn"s disease and ulcerative colitis: relevance to its adverse role in the disease. Inflamm. Bowel Dis. **18**, 1101–11.

20 Dhawan, S., Cailotto, C., Harthoorn, L. F. and de Jonge, W. J. (2012) Cholinergic signalling in gut immunity. Life Sci. **91**, 1038–1042.

21 Van Der Zanden, E. P., Boeckxstaens, G. E. and de Jonge, W. J. (2009) The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. Neurogastroenterol. Motil. **21**, 6–17.

22 De Jonge, W. J. and Ulloa, L. (2007) The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. Br. J. Pharmacol. **151**, 915–929.

23 Van der Zanden, E. P., Snoek, S. A., Heinsbroek, S. E., Stanisor, O. I., Verseijden, C., Boeckxstaens, G. E., Peppelenbosch, M. P., Greaves, D. R., Gordon, S. and De Jonge, W. J. (2009) Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor alpha4beta2. Gastroenterology **137**, 1029–39, 1039.e1–4.

24 Van der Zanden, E. P., Hilbers, F. W., Verseijden, C., van den Wijngaard, R. M., Skynner, M., Lee, K., Ulloa, L., Boeckxstaens, G. E. and de Jonge, W. J. (2012) Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals. Neuroimmunomodulation **19**, 255–65.

25 Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., et al. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature **421**, 384–388.

26 Pelissier-Rota, M., Lainé, M., Ducarouge, B., Bonaz, B. and Jacquier-Sarlin, M. (2013) Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer: Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation? J. Cancer Ther. **04**, 1116–1131.

27 Choi, A. M. K., Ryter, S. W. and Levine, B. (2013) Autophagy in human health and disease. N. Engl. J. Med. **368**, 1845–6.

28 Rubinsztein, D. C., Codogno, P. and Levine, B. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nat. Rev. Drug Discov. **11**, 709–30.

29 Henckaerts, L., Cleynen, I., Brinar, M., John, J. M., Van Steen, K., Rutgeerts, P. and Vermeire, S. (2011) Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn"s disease. Inflamm. Bowel Dis. **17**, 1392–7.

30 Lees, C. W., Barrett, J. C., Parkes, M. and Satsangi, J. (2011) New IBD genetics: common pathways with other diseases. Gut **60**, 1739–53.

31 Benbrook, D. M. and Long, A. (2012) Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. Exp. Oncol. **34**, 286–97.

32 De Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. **28**, 435–92.

33 Giordano, S., Darley-Usmar, V. and Zhang, J. (2014) Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. Redox Biol. **2**, 82–90.

34 Kongara, S. and Karantza, V. (2012) The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. Front. Oncol. **2**, 171.

35 Okada, F., Kawaguchi, T., Habelhah, H., Kobayashi, T., Tazawa, H., Takeichi, N., Kitagawa, T. and Hosokawa, M. (2000) Conversion of human colonic adenoma cells to adenocarcinoma cells through inflammation in nude mice. Lab. Invest. **80**, 1617–28.

36 Buchanan, F. G., Wang, D., Bargiacchi, F. and DuBois, R. N. (2003) Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. **278**, 35451–7.

37 Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, E., Roberts, H. R. and Williams, A. C. (2009) The COX-2 / PGE 2 pathway : key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment **30**, 377–386.

38 Leone, V., di Palma, A., Ricchi, P., Acquaviva, F., Giannouli, M., Di Prisco, A. M., Iuliano, F. and Acquaviva, A. M. (2007) PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **293**, G673–81.

39 Sheehan, K. M., Sheahan, K., O"Donoghue, D. P., MacSweeney, F., Conroy, R. M., Fitzgerald, D. J. and Murray, F. E. (1999) The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA **282**, 1254–7.

40 Sheehan, K. M., O"Connell, F., O"Grady, A., Conroy, R. M., Leader, M. B., Byrne, M. F., Murray, F. E. and Kay, E. W. (2004) The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **16**, 619–25.

41 Sonoshita, M., Takaku, K., Oshima, M., Sugihara, K. and Taketo, M. M. (2002) Cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts and endothelial cells of intestinal polyps. Cancer Res. **62**, 6846–9.

42 Gupta, R. A. and Dubois, R. N. (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat. Rev. Cancer **1**, 11–21.

43 Kefalakes, H., Stylianides, T. J., Amanakis, G. and Kolios, G. (2009) Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? Eur. J. Clin. Pharmacol. **65**, 963–70.

44 Chartier, N. T., Lainé, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. a, Matos, P., Block, M. R. and Jacquier-Sarlin, M. R. (2006) Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. J. Cell Sci. **119**, 31–46.

45 Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol. Sci. **25**, 317–324.

46 Lee, J., Giordano, S. and Zhang, J. (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. Biochem. J. **441**, 523–40.

47 Rissanen, A., Sivenius, J. and Jolkkonen, J. (2006) Prolonged bihemispheric alterations in unfolded protein response related gene expression after experimental stroke. Brain Res. **1087**, 60–6.

48 Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A. and Mori, K. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev. Cell **13**, 365–376.

49 Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. **19**, 5720–8.

50 Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. EMBO Rep. **2**, 330–335.

51 Chen, Y., Azad, M. B. and Gibson, S. B. (2010) Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. Can. J. Physiol. Pharmacol. **88**, 285–95.

52 Choudhary, S., Kumar, A., Kale, R. K., Raisz, L. G. and Pilbeam, C. C. (2004) Extracellular calcium induces COX-2 in osteoblasts via a PKA pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. **322**, 395–402.

53 Si, J., Fu, X., Behar, J., Wands, J., Beer, D. G., Souza, R. F., Spechler, S. J., Lambeth, D. and Cao, W. (2007) NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF-kappaB in Barrett"s esophageal adenocarcinoma cells. J. Biol. Chem. **282**, 16244–55.

54 Löffler, I., Grün, M., Böhmer, F. D. and Rubio, I. (2008) Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. BMC Cancer **8**, 380.

55 Ho, Y.-C. and Chang, Y.-C. (2006) Regulation of nicotine-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human gingival fibroblasts. Acta Pharmacol. Sin. **27**, 409–13.

56 Shin, V. Y., Wu, W. K. K., Chu, K.-M., Wong, H. P. S., Lam, E. K. Y., Tai, E. K. K., Koo, M. W. L. and Cho, C.-H. (2005) Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. Mol. Cancer Res. **3**, 607–15.

57 Yang, W. L. and Frucht, H. (2000) Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. Carcinogenesis **21**, 1789–93.

58 Kojima, M., Morisaki, T., Izuhara, K., Uchiyama, A., Matsunari, Y., Katano, M. and Tanaka, M. (2000) Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. Oncogene **19**, 1225–31.

59 Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A., Farrow, S. and Howells, L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. Oncogene **18**, 6013–20.

60 Tazawa, R., Xu, X. M., Wu, K. K. and Wang, L. H. (1994) Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. **203**, 190–9.

61 Barbieri, S. S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E. and Colli, S. (2004) Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. Free Radic. Biol. Med. **37**, 156–65.

62 Feng, L., Xia, Y., Garcia, G. E., Hwang, D. and Wilson, C. B. (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. J. Clin. Invest. **95**, 1669–75.

63 Kim, H., Rhee, S. H., Kokkotou, E., Na, X., Savidge, T., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. (2005) Clostridium difficile toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. J. Biol. Chem. **280**, 21237–45.

64 Martindale, J. L. and Holbrook, N. J. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell. Physiol. **192**, 1–15.

65 Ng, D. C., Shafaee, S., Lee, D. and Bikle, D. D. (2000) Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. J. Biol. Chem. **275**, 24080–8.

66 Van Haasteren, G., Li, S., Muda, M., Susini, S. and Schlegel, W. Calcium signalling and gene expression. J. Recept. Signal Transduct. Res. **19**, 481–92.

67 Okada, Y., Voznesensky, O., Herschman, H., Harrison, J. and Pilbeam, C. (2000) Identification of multiple cis-acting elements mediating the induction of prostaglandin G/H synthase-2 by phorbol ester in murine osteoblastic cells. J. Cell. Biochem. **78**, 197–209.

68 Xie, W. and Herschman, H. R. (1996) Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. J. Biol. Chem. **271**, 31742–8.

69 Zhu, Y., Zhu, M. and Lance, P. (2012) iNOS signaling interacts with COX-2 pathway in colonic fibroblasts. Exp. Cell Res. **318**, 2116–27.

70 Zhu, Y., Zhu, M. and Lance, P. (2012) IL1β-mediated Stromal COX-2 signaling mediates proliferation and invasiveness of colonic epithelial cancer cells. Exp. Cell Res. **318**, 2520–30.

71 Di Popolo, a, Memoli, a, Apicella, a, Tuccillo, C., di Palma, a, Ricchi, P., Acquaviva, a M. and Zarrilli, R. (2000) IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. Oncogene **19**, 5517–24.

72 Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S. K., Dey, S. K. and DuBois, R. N. (2004) Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. Cancer Cell **6**, 285–95.

73 Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H.-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. J. Biol. Chem. **278**, 12752–8.

74 Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M. and Taketo, M. M. (2001) Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. Nat. Med. **7**, 1048–51.

75 Chell, S. D., Witherden, I. R., Dobson, R. R., Moorghen, M., Herman, A. A., Qualtrough, D., Williams, A. C. and Paraskeva, C. (2006) Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence. Cancer Res. **66**, 3106–13.

76 Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., et al. (2002) Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. Cancer Res. **62**, 28–32.

77 Löffler, I., Grün, M., Böhmer, F. D. and Rubio, I. (2008) Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. BMC Cancer **8**, 380.

78 Lalier, L., Pedelaborde, F., Braud, C., Menanteau, J., Vallette, F. M. and Olivier, C. (2011) Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cell. BMC Cancer **11**, 153.

79 Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D. R., Bedford, J. S. and Li, C.-Y. (2010) Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci. Signal. **3**, ra13.

80 Elander, N., Ungerbäck, J., Olsson, H., Uematsu, S., Akira, S. and Söderkvist, P. (2008) Genetic deletion of mPGES-1 accelerates intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. **372**, 249–53.

81 Hotamisligil, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell **140**, 900–17.

82 Csordás, G. and Hajnóczky, G. (2009) SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. Biochim. Biophys. Acta **1787**, 1352–1362.

83 Yuzefovych, L. V, LeDoux, S. P., Wilson, G. L. and Rachek, L. I. (2013) Mitochondrial DNA damage via augmented oxidative stress regulates endoplasmic reticulum stress and autophagy: crosstalk, links and signaling. PLoS One **8**, e83349.

84 Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. and Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. J. Biol. Chem. **277**, 34287–94.

85 Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature **403**, 98–103.

86 Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2006) Microdomains of intracellular Ca2+: molecular determinants and functional consequences. Physiol. Rev. **86**, 369–408.

87 Decuypere, J.-P., Welkenhuyzen, K., Luyten, T., Ponsaerts, R., Dewaele, M., Molgó, J., Agostinis, P., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B., et al. (2011) Ins(1,4,5)P3 receptor-mediated Ca2+ signaling and autophagy induction are interrelated. Autophagy **7**, 1472–89.

88 Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007) Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. Mol. Cell **25**, 193–205.

89 Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **8**, 741–52.

90 Maiuri, M. C., Criollo, A. and Kroemer, G. (2010) Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. EMBO J. **29**, 515–6.

91 Bertolotti, a, Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., West, a B. and Ron, D. (2001) Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. J. Clin. Invest. **107**, 585–93.

92 Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., Thornton, D. J., Png, C. W., Crockford, T. L., Cornall, R. J., et al. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. PLoS Med. **5**, e54.

93 Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E. S., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H., et al. (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. Cell **134**, 743–756.

94 Shkoda, A., Ruiz, P. A., Daniel, H., Kim, S. C., Rogler, G., Sartor, R. B. and Haller, D. (2007) Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. Gastroenterology **132**, 190–207.

95 Scharl, M., Wojtal, K. A., Becker, H. M., Fischbeck, A., Frei, P., Arikkat, J., Pesch, T., Kellermeier, S., Boone, D. L., Weber, A., et al. (2012) Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 regulates autophagosome formation in human intestinal cells. Inflamm. Bowel Dis. **18**, 1287–302.

96 Nys, K., Agostinis, P. and Vermeire, S. (2013) Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn"s disease? Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. **10**, 395–401.

97 Chen, N. and Karantza-Wadsworth, V. (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim. Biophys. Acta **1793**, 1516–1523.

98 Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell **10**, 51–64.

99 Bernstein, C. N., Wajda, A. and Blanchard, J. F. (2005) The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology **129**, 827–36.

100 Grivennikov, S. I. (2013) Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. Semin. Immunopathol. **35**, 229–244.

101 Sansone, P., Piazzi, G., Paterini, P., Strillacci, A., Ceccarelli, C., Minni, F., Biasco, G., Chieco, P. and Bonafè, M. (2009) Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells. J. Cell. Mol. Med. **13**, 3876–3887.

102 Brown, J. R. and DuBois, R. N. (2005) COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. J. Clin. Oncol. **23**, 2840–55.

103 Bonaz, B., Picq, C., Sinniger, V., Mayol, J. F. and Clarençon, D. (2013) Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. Neurogastroenterol. Motil. **25**, 208–221.

104 Borovikova, L. V, Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M. and Tracey, K. J. (2000) Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. Auton. Neurosci. **85**, 141–147.

105 Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F. and Collins, S. M. (2006) The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. Gastroenterology **131**, 1122–30.

106 Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, a, Mouret, C., Sinniger, V., Picq, C., Job, a, Canini, F., Jacquier-Sarlin, M., et al. (2011) Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. Auton. Neurosci. **160**, 82–9.

107 Pavlov, V. A. and Tracey, K. J. (2006) Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. Biochem. Soc. Trans. **34**, 1037–40.

108 Frucht, H., Jensen, R. T., Dexter, D., Yang, W. L. and Xiao, Y. (1999) Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. Clin. Cancer Res. **5**, 2532–2539.

109 Von Rosenvinge, E. C. and Raufman, J.-P. (2011) Muscarinic receptor signaling in colon cancer. Cancers (Basel). **3**, 971–981.

110 Raufman, J.-P., Cheng, K., Saxena, N., Chahdi, A., Belo, A., Khurana, S. and Xie, G. (2011) Muscarinic receptor agonists stimulate matrix metalloproteinase 1-dependent invasion of human colon cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **415**, 319–24.

111 Raufman, J.-P., Samimi, R., Shah, N., Khurana, S., Shant, J., Drachenberg, C., Xie, G., Wess, J. and Cheng, K. (2008) Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. Cancer Res. **68**, 3573–8.

112 McGilligan, V. E., Wallace, J. M. W., Heavey, P. M., Ridley, D. L. and Rowland, I. R. (2007) The effect of nicotine in vitro on the integrity of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. Food Chem. Toxicol. **45**, 1593–8.

113 Catassi, A., Servent, D., Paleari, L., Cesario, A. and Russo, P. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. Mutat. Res. **659**, 221–31.

114 Green, J. T., Thomas, G. A. and Rhodes, J. (1997) Nicotine: therapeutic potential for the treatment of ulcerative colitis. Expert Opin. Investig. Drugs **6**, 17–22.

115 Sandborn, W. J. (1999) Nicotine therapy for ulcerative colitis: a review of rationale, mechanisms, pharmacology, and clinical results. Am. J. Gastroenterol. **94**, 1161–71.

116 McGilligan, V. E., Wallace, J. M. W., Heavey, P. M., Ridley, D. L. and Rowland, I. R. (2007) Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. Inflamm. Bowel Dis. **13**, 108–15.

117 Pullan, R. D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J. S., Williams, G. T., Newcombe, R. G., Russell, M. A., Feyerabend, C. and Thomas, G. A. (1994) Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. N. Engl. J. Med. **330**, 811–5.

118 Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S., Banerjee, S., Carless, M., Kim, E., Coppola, D., et al. (2009) Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. Int. J. Cancer **124**, 36–45.

119 Michaelson, J. E., Ritzenthaler, J. D. and Roman, J. (2002) Regulation of serum-induced fibronectin expression by protein kinases, cytoskeletal integrity, and CREB. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. **282**, L291–301.

120 Zheng, Y., Ritzenthaler, J. D., Roman, J. and Han, S. (2007) Nicotine stimulates human lung cancer cell growth by inducing fibronectin expression. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **37**, 681–90.

121 Wei, P.-L., Kuo, L.-J., Huang, M.-T., Ting, W.-C., Ho, Y.-S., Wang, W., An, J. and Chang, Y.-J. (2011) Nicotine enhances colon cancer cell migration by induction of fibronectin. Ann. Surg. Oncol. **18**, 1782–90.

122 Shin, V. Y., Wu, W. K. K., Ye, Y.-N., So, W. H. L., Koo, M. W. L., Liu, E. S. L., Luo, J.-C. and Cho, C.-H. (2004) Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. Carcinogenesis **25**, 2487–95.

123 Wong, H. P. S., Yu, L., Lam, E. K. Y., Tai, E. K. K., Wu, W. K. K. and Cho, C.-H. (2007) Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. Toxicol. Sci. **97**, 279–87.

124 Grando, S. A. (2008) Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. J. Pharmacol. Sci. **106**, 174–9.

125 Pettersson, A., Nylund, G., Khorram-Manesh, A., Nordgren, S. and Delbro, D. S. (2009) Nicotine induced modulation of SLURP-1 expression in human colon cancer cells. Auton. Neurosci. **148**, 97–100.

Crosstalk between muscarinic and CRF2 receptors to regulate cellular adhesion properties of human colon cancer cells

M. Pelissier-Rota[1, 2], N. T. Chartier[2, 3] and M.R. Jacquier-Sarlin[1, 2]

From : *1 : INSERM U836, Grenoble institut des Neurosciences, Grenoble Cedex 9, F-38042, France. 2 : Université Joseph Fourier, BP170 Grenoble Cedex 9, F-38042, France. 3 : INSERM, U823; Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38700.*

Address: *1: INSERM U836, Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, BP 170, Grenoble Cedex 09, F-38042, France. 2: Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP170 Grenoble Cedex 09, F-38041, France. 3: CNRS UMR 5163, Equipe Génomique et Evolution des Microorganismes, BP170 Grenoble Cedex 9, F-38042, France. 4: Université Joseph Fourier, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, BP170 Grenoble Cedex 09, F-38041, France. 5: Université Joseph Fourier, Centre Universitaire de Biologie Expérimentale, BP 53, Grenoble Cedex 09, F-38041, France.*

[$]To whom correspondence should be addressed: Muriel Jacquier-Sarlin, *Centre de Recherche Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences. Equipe du Stress et des Interactions Neurodigestives, Site Santé BP 170 La Tronche F-38042 Grenoble Cedex 9, France*. Tel.: (+33) 456-52-06-50; Fax: (+33) 456-52-05-54; E-mail: muriel.jacquier-sarlin@ujf-grenoble.fr

***Keywords*:** Acetylcholine, Cell adhesion, colorectal cancer, Corticotropin Releasing Factor, muscarinic receptor, stress, tumor progression.

Abbreviations: AJ: adherens junctions, ctn: catenin, CRC: colorectal cancer, CRF2, corticotrophin releasing factor receptor 2, ECM: extracellular matrix, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, EMT: epithelial-mesenchymal transition, FA: focal adhesion, GPCR, G protein coupled receptor, MMP: matrix metalloprotease, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, Ucn: urocortin.

Abstract

Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD), such as Crohn's disease or ulcerative colitis, often suffer from chronic and re-lapsing intestinal inflammation that favors the development of colitis associated cancer (CAC). Altered epithelial intestinal barrier function implicated in the pathophysiology of IBD, is a suspected consequence of stress. It has been proposed that corticotrophin-releasing factor receptor (CRF2) acts on cholinergic nerves to induce stress-mediated epithelial barrier dysfunction. Nonneuronal acetylcholine (ACh) thought muscarinic receptors (mAChR) also contributes to alteration of epithelial cell functions. In this study, we investigated the mechanisms through which stress and ACh modulate epithelial cell adhesive properties. We show that ACh-induced activation of mAChR in HT-29 cells results in cell dissociation together with changes in cell-matrix contacts, which correlates with the acquisition of invasive potential. ACh-induced secretion of laminin332 leads to $\alpha 3\beta 1$ integrin activation and RhoA-dependent reorganization of actin cytoskeleton. We show that ACh-mediated effects on cell adhesion are blocked by astressin 2b, a CRF2 antagonist, suggesting that ACh action also depends on CRF2 signaling. This is reinforced by the fact that ACh stimulates both the synthesis and the release of CRF2 ligands in HT-29 cells. Downstream CRF2 signaling involves Src/Erk and FAK activation. In summary, our data give evidences for a novel intracellular circuit involving mAChR acting on CRF2-signaling that could mediate colonic mucosal barrier dysfunction and exacerbate mucosal inflammation. This pathway may be an important component of the pro-inflammatory and pro-tumoral processes involved in IBD and CRC pathology development respectively.

I. **Introduction**

The colon epithelium forms a barrier through cell-cell interactions, involving dynamic structures such as tight junctions and cadherin-based adherens junctions (AJ). These intercellular junctions are subject to modulation during epithelial tissue remodeling, wound repair, inflammation and tumorigenic transformation. In this last case, epithelial cells transform into cells with a mesenchymal phenotype characterized by alterations in cell-cell contacts, cell-matrix interactions and the cytoskeletal structures.

Inflammatory Bowel Disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are multifactorial chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract. An increased intestinal permeability due to defective epithelial barrier coupled with a dysfunctional immune response have been described as a causative mechanism for the development of chronic intestinal inflammation (Scharl & Rogler, 2012). Indeed, alterations of the intestinal permeability have been observed not only in inflamed gut tissues but also in areas lacking any sign of macroscopic injury (Fries et al., 1999; Marin et al., 1983). Transgenic models revealed the importance of E-cadherin in maintaining the epithelial barrier by showing that AJ contributed to IBD-like processes (for review (Zbar, Simopoulos, & Karayiannakis, 2004). E-cadherin mRNA transcripts were expressed in actively inflamed mucosa of IBD patients, while the protein level is reduced, suggesting a post-transcriptional regulation of barrier integrity as it was observed with cytokines and several growth factor (Radford-Smith & Jewell, 1996). The chronic inflammatory states may lead to environments that foster genomic lesions and tumors initiation (Feagins, Souza, & Spechler, 2009). Furthermore, disorganization of intercellular junctions could also participate in the cellular dedifferentiation processes that precede carcinogenesis (Jankowski, Bedford, & Kim, 1997). Long-standing IBD can induce further complication and patients have an increased risk of developing other pathologies such as colorectal cancer. Colitis associated cancer (CAC) is a type of colon cancer that is preceded by clinically detectable IBD. Development of malignancies is more frequent in UC patients where the epithelial alterations are more pronounced, suggesting that disturbance of junction associated molecules are likely to be involved in carcinogenesis from IBD patient.

Consistent epidemiology works support the adverse influence of stress in the development and/or aggravation of gastrointestinal disorders such as IBD, although these observations are actually debated (Hisamatsu et al., 2007; Maunder & Levenstein, 2008; Mawdsley & Rampton, 2006; Paul R Saunders et al., 2002). Stress effects are mediated

though the secretion of specific stress neuromediators, such as corticotrophin releasing factor (CRF) or its analogs, Urocortin (Ucn) 2 and 3 (Javier Santos et al., 2008). These peptides act through the corticotrophin releasing factor receptors 1 and 2 (CRF1/CRF2), two class II G protein coupled receptor (GPCR) with different affinities (Bale & Vale, 2004). Ligands and receptors whose expression are regulated by stress and inflammation in the GI tract, are expressed and secreted by various normal and cancer cells (Kaprara, Pazaitou-Panayiotou, Kortsaris, & Chatzaki, 2010; Larauche, Kiank, & Tache, 2009). Animal models and *in vitro* experiments have shown that acute or chronic stress impairs the intestinal barrier by various mechanism involving cytokines or kinases mediated regulation of cell junctions (for review (B Ducarouge, 2011). Using two CRC cell lines, we have previously demonstrated that CRF2 signals through Src/Erk pathway to induce the alteration of cell-cell junctions following by endocytosis of E-cadherin and shuttling of p120ctn into the nucleus (Benjamin Ducarouge et al., 2013a). This signaling pathway also leads to the remodeling of cell-ECM adhesion complexes by the phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK), which stimulates migration and invasion. Such action of the CRF system *via* CRF2 signaling represents a key pathway supporting pro inflammatory and tumoral effects.

Epidemiological studies report that the long-term administration of anti-inflammatory drugs decreases the risk of colon carcinoma (Sansone et al., 2009). The conventional medical therapy for IBD also consist to reduce the inflammatory response using various strategy that have severe side-effects (Nys, Agostinis, & Vermeire, 2013). During the last decade, the activation of the cholinergic system has been proposed as a new strategy for treating IBD patients, according to its anti-inflammatory potential on immune cells (Bonaz, Picq, Sinniger, Mayol, & Clarençon, 2013). In experimental models of inflammatory disease, vagus nerve stimulation (VNS) attenuates the production of pro-inflammatory cytokines and inhibits the inflammatory process (Borovikova et al., 2000; Ghia, Blennerhassett, Kumar-Ondiveeran, Verdu, & Collins, 2006; Meregnani et al., 2011). This effect is mediated by the release of acetylcholine (ACh), which activates the α7 nicotinic ACh receptor (α7nAChR) expressed in macrophages (Pavlov & Tracey, 2006). However ACh is also the prototypical muscarinic receptor (mAChR) ligand, which are express together with α7nAChR on epithelial cells. Colon epithelial cells express mAChR subtypes 1 and 3. M3 mAChR, which is expressed in cancer cells (Frucht, Jensen, Dexter, Yang, & Xiao, 1999a; Wang et al., 2003) is considered as a strong intestinal tumor promoter (Von Rosenvinge & Raufman, 2011). Previously, we found that ACh-induced activation of mAChR results in the modulation of cell adhesion

properties correlating with the acquisition of invasive potential, whereas activation of α7nAChR exerts a protective role on epithelium integrity (Pelissier-Rota, Lainé, Ducarouge, Bonaz, & Jacquier-Sarlin, 2013). Using different *in vivo* models, Raufman et al., showed that m3AChR gene ablation decreases both colon tumor number, size and the degree of dysplasia (Raufman et al., 2008a; Raufman, Cheng, et al., 2011).

Recently it has been proposed that psychological stress-induced barrier dysfunction was dependent on the release of ACh by enteric nerves following CRF activation (Demaude et al., 2009; Gareau, Jury, & Perdue, 2007). These data indicate that the CRF system can control changes in local ACh level.

In the present study, we characterize the crosstalk between stress and epithelial cholinergic signaling and its effects on the regulation of intestinal epithelium integrity. We present evidences for a novel intracellular circuit involving muscarinic receptors on CRF2-signaling, leading modulation of cell adhesion and invasion in colon cancer cells. This mechanism involves the activation of the Src/Erk/FAK pathway, the Rho-GTPase-dependent remodeling of actin cytoskeleton and laminin 332-mediated activation of α3β1 integrins. This regulation may be an important component of the pro-inflammatory and pro-tumoral processes involved in IBD and CRC pathology development respectively.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell line HT-29 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) was cultured at 37°C in a 5% CO2 atmosphere in DMEM containing 25 mM glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and supplemented with 10% FCS, 5% penicillin and streptomycin. The human CRF2-GFP construct was cloned into the pBabe expression vector. Retroviral infections of HT-29 cells were done as described previously (Chartier et al., 2006) and then cultured in medium containing 2 μg/mL puromycin (BD biosciences), following to FACS selection of virus infected cells.

2.1. Antibodies and reagent

Polyclonal antibodies (pAbs) directed against CRF2 were from Abcam (12964, Paris, France). The immunizing peptide used to generate the CRF2 antibody was designed in the conserved sequence of the α, β and γ isoforms. This antibody would then recognize all isoforms of the receptor. Anti-human E-cadherin (HECD1) monoclonal antibody (mAb) was obtained from Takara Biochemicals (Cambrex Bio Science, Paris, France). Polyclonal antibodies directed against Src-P^{Tyr418} were purchased from MBL Calbiochem (Fontenay-sous-Bois, France), monoclonal anti-Src antibodies were from Millipore (Molsheim, France). mAb against ERK was from BD transduction laboratories and mAb against ERK-P^{Tyr204} and pAbs anti-RhoA were from Santa cruz (TEBU, Le perray en Yvelines, France). pAb anti-FAK-P^{Ser910} and mAb P4C10 against β1 integrin were obtained from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). The function blocking anti-integrin mAbs used were GoH3 against α6 integrin, P1B5 against α3 integrin, and BHA2.1 against α2β1, all from Chemicon (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Anti-actin pAbs were obtained from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). mAbs anti-laminin α3 chain, BM165 was a gift of P. Rousselle (Lyon). Anti-Rac1 mAbs were obtained from Upstate Biotechnology. Alexa–conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Horse Radish Peroxydase–conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France), donkey anti-rabbit antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch (Immunotech, Marseille, France). Topro3 was purchased from Invitrogen. Urocortins, CRF and Astressin 2b were purchased from Sigma Aldrich.

Table1*. *Oligonucleotides sequences of primers used for RT-PCR.

Oligonucleotides	Forward	Reverse
Ucn3	GGAGGGAAGTCCACTCTCG	GGGCTTGGCTTTGTAGAACTT
MMP3	TGTAGAAGGCACAATATGG	CAGTCACTTGTCTGTTGCACA
MMP7	ATGGGAACTGCTGACATC	CCAGCGTTCATCCTCATCGA
MMP9	GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCT	GTCGCCCTCAAAGGTTTGGAAT
GAPDH	GAACATCATCCCTGGCTCTACTGG	AATGCCAGCCCCAGCGTCTACTGG

2.3. RT -PCR

Total RNA extractions were performed using Trizol™ reagent and 1µg of total RNA was denaturized and subsequently processed for reverse transcription using M-MLV (Invitrogen) according to manufacturer's instructions and run on Thermocycler (Eppendorf). Primers sequences and probes are summarized in Table 1. PCR conditions are: 5 min at 92°C followed by 35 cycles (40 sec at 92°C, 40 sec at 60°C and 1 min at 72°C) and 10 min at 72°C. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel. Quantification was performed using Image J (NIH software). GAPDH was used as housekeeping gene.

2.4. Quantification of Ucn3

Total Lysates (300 µg of proteins) and cell culture supernatants (200 µL) were absorbed overnight in a Microtiter plate (96-well maxisorb nunc). Then the plate was washed three times with PBS. After saturation with PBS-3%(w/v) BSA, Ucn3 protein levels were estimated by an enzyme-linked immune sorbent assay with the use of Ucn3 mAb (1/1000) for 60 min at 37°C. Detection was performed with a rabbit anti-mouse conjugated Ab with horseradish peroxidase and 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzothiazoline-6 sulfonic acid) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) as substrate. Absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader. All experimental conditions were performed in triplicate.

2.5. Western blot and Immunoprecipitation.

Total lysates were processed for western blot as described previously (Chartier et al., 2006).

2.6. Immunofluorescent staining.

Cells were grown on glass coverslips and then treated as described previously (Chartier et al., 2006). After fixation with 3% (w/v) paraformaldehyde, 4% (w/v) sucrose for 10 min at 37°C, non-specific sites were blocked for 1h at 37°C with 3% BSA 0.5% Tween20. Then cells were incubated for 1h at 37°C with specific antibodies which were diluted in the blocking solution at 1:100 for primary and 1:500 for secondary antibodies. Fluorescence photomicrographs were taken with a confocal microscope at the x100 objective (Leica TCS SPE) or an epifluorescence microscope at the x100 objective (ZEISS, AvioVert 200M).

2.7. Cell-cell aggregation assay.

HT-29 cells were harvested from monolayer cultures as previously described to preserve cadherins at the cell surface. Cells were suspended at 10^6 cells/mL of TBS containing 10 mM HEPES/1 mM$CaCl_2$. Aggregation assays were performed in a 24-well plate saturated with BSA and extensively washed. The cell suspensions were incubated at 37°C in a gyratory shaker at 75 rpm for 60 min. Cell aggregation was observed with an inverted microcope (Zeiss Axiovert 135) under phase contrast and photographs were taken with a CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd.).

2.8. Measurement of transepithelial electrical resistance (TEER).

HT-29 cells (2.5 10^{-5}) were placed in the top compartment of a 24-multiwell insert plate (Corning PET) with 0.4 µm pore size and cultured until confluence. Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured as described previously (Rao, Baker, & Baker, 1999) using a Millicell Electrical Resistance System (Millipore, Bedford, MA). TEER was calculated as ohm times centimeter squared (Ω. cm2) by multiplying it with the surface area of the monolayer. The TEER of the polyester membrane in Transwells (approximately 30 (Ω. cm2) was subtracted from all readings.

2.9. Small Rho-GTPAses pull-down assays.

Rac1-GTP: Levels of active Rac1 were estimated using the Rac-binding domain of p21-activated kinase (PAK) as previously described (Lu & Mayer, 1999) and adapted in (Chartier et al., 2006). GTP-bound Rac1 was analyzed by western blotting with anti-Rac1 antibody. Whole cell lysates were run in parallel.

RhoA-GTP: Levels of active RhoA were estimated using the Rho-binding domain of Rhotekin as described (Ren, Kiosses, & Schwartz, 1999) and adapted in (Gout, Jacquier-Sarlin, Rouard-Talbot, Rousselle, & Block, 2001). GTP-bound RhoA was analyzed by western blotting with anti-RhoA antibody. Whole cell lysates were run in parallel.

2.10. Cell invasion assays.

HT-29 cells (2.5 10^{-5}/mL) were placed in the top compartment of a 24-multiwell insert plate (BD Falcon) that was separated from the bottom compartment by BD-Matrigel Matrix membrane, with 0.4-µm pore size. Serum-free RPMI with or without Ucn3/ ACH (100 nM) in presence or not of A2B (10 µM) were added into the top compartment and 10% FCS into the bottom compartment. After 48h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere, coton swabs were used to

remove cells on the upper surface of transwells. After fixation with 4% (w/v) PFA, cells that had invaded through the Matrigel were stained with Hematoxylin and manually counted under the microscope. The mean values +/- SEM were calculated and analyzed using Student's test.

2.11. Gelatin degradation assays.

About 40 µL (20-30 µg cell protein) harvested culture medium were electrophoresed under nonreducing conditions in a 10% acrylamide gel containing 1 mg/mL gelatine (Sigma-Aldrich), according to the method previously described (Werb, Tremble, Behrendtsen, Crowley, & Damsky, 1989). After electrophoresis, the gels were washed at room temperature for 3 X 30 min in 2% (w/v) Triton X-100 and overnight at 37°C in buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.7) and 5 mM $CaCl_2$. Thereafter, gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250 in 50% (v/v) isopropyl alcohol/10% (v/v) glacial acetic acid for 60 min and destained in 20% (v/v) isopropyl alcohol/5% (v/v) glacial acetic acid.

2.12 Immunocytochemical detection of secreted Laminin332 (LN332).

HT-29 cells were incubated 48h on glass coverslips and then exposed or not to UCN3 (100 nM) or ACh (100 nM) for 24h. Immunodetection of LN332 deposit on the glass coverslip was performed after cell removal by 1h treatment with a solution containing 1% (v/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, and 25 mM Tris-HCl, pH 7.5. Then coverslips were washed three times with PBS and fixed with 3% (w/v) paraformaldehyde, 2% (w/v) sucrose for 10 min at 37°C. After incubation for 1h at room temperature with blocking solution (10% (v/v) goat serum in PBS) to reduce background signal, LN332 was detected with mAb BM165 diluted (1/50) in blocking solution (1h at 37°C). After washing in PBS-0.05% (w/v) Tween 20, detection was continued with anti-mouse conjugated to Alexa488 for 45 min a 37°C. Coverslips were mounted with Mowiol (Calbiochem, Meudon, France). Fluorescence photomicrographs were taken with an epifluorescence microscope at the x100 objective (ZEISS, AvioVert 200M).

2.13. Quantification of secreted Laminin332.

HT-29 cells (5 x 10^4 cells/well) were in a 96-well plate. After 48h of culture the cells were stimulated or not with ACh for 24h and then lyzed in 20 mM NH_4OH for 15 min at 37°C. Then the plate was washed three times with distilled water and twice with PBS. After saturation with PBS-3% (w/v) BSA, the LN332 secreted onto the matrix was estimated by an enzyme-linked immune sorbent assay with the use of BM165 mAb (1/1000 of hybridoma supernatant from culture medium) for 60 min at 37°C. Detection was performed with a rabbit anti-mouse

conjugated with horseradish peroxidase and 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzothiazoline-6 sulfonic acid) (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) as substrate. Absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader. All experimental conditions were performed in triplicate.

2.14. Cell adhesion and inhibition assays.

Tissue culture dishes were coated with LN332 using the following methods: A431 epidermoid cells were cultured to confluence on various surfaces at 37°C to allow for the deposit of LN332, then cells were removed as previously described (Wayner, Gil, Murphy, Wilke, & Carter, 1993; Weitzman, Pasqualini, Takada, & Hemler, 1993). Briefly, confluent monolayers were sequentially extracted with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS, followed by 2M urea in 1M NaCl. All extraction buffers contained protease inhibitors (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 2 mM N-ethylmaleimide). Plates were washed in PBS, incubated with 3% (w/v) BSA in PBS for 2 hours at 37°C to block nonspecific adhesion, and stored at -20°C. HT-29 cells cultured during 24h with ACh 100 nM were harvested and further pretreated or not with 100 nM ACh for 30 min before to be plated ($5x10^4$ cells/ well) in triplicate in coated 96-well microtiter plates and incubated for 60 min at 37°C. In some experiments, cells were pretreated overnight with Astressin 2b (1 μM). Non-adherent cells were removed by washing three times with PBS, and cell adhesion was estimated by a colorimetric cell proliferation assay (CellTiter 96 AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega).

In inhibition assays, the cells were pre-incubated with the appropriate dilution of antibodies for 30 min before plating onto coated plates for a 60 min adhesion assay.

2.15. Densitometric analysis and statistics.

Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. All graphs represent the mean value ± SEM of protein expression levels measured by densitometric analysis in "Image J" software (NIH). The relative expression levels of mRNA or proteins were determined as follows: the expression of level of each transcript or protein was normalized to i) their housekeeping gene in RT-PCR; ii) to actin in whole lysate westernblots. In some experiments and in order to display a fold increase over control, the relative expression of transcripts or proteins in control conditions was set to 1. Statistics are unpaired t-test and statistical significance is given by the number of asterisks (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

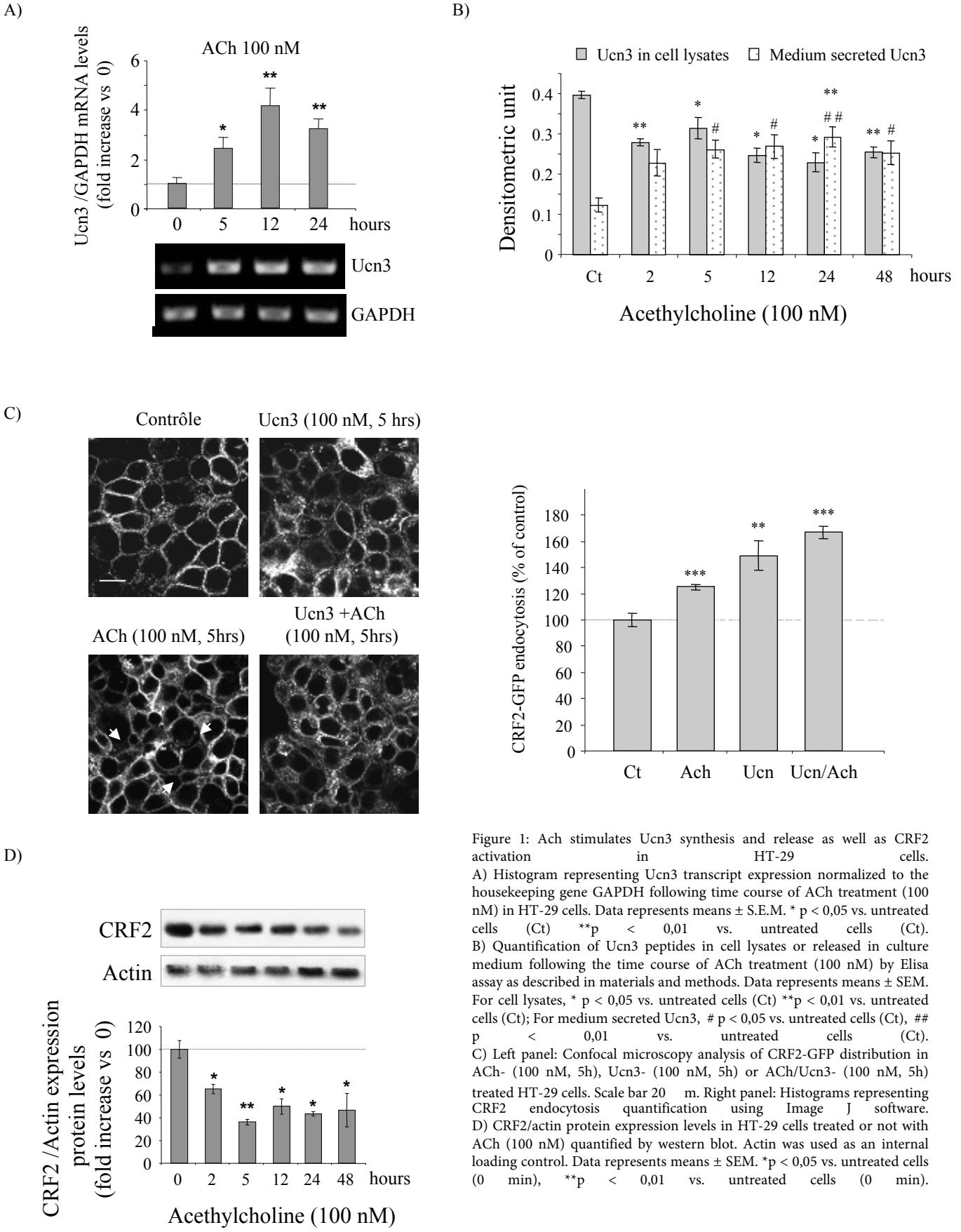


Figure 1: Ach stimulates Ucn3 synthesis and release as well as CRF2 activation in HT-29 cells.
A) Histogram representing Ucn3 transcript expression normalized to the housekeeping gene GAPDH following time course of ACh treatment (100 nM) in HT-29 cells. Data represents means ± S.E.M. * p < 0,05 vs. untreated cells (Ct) **p < 0,01 vs. untreated cells (Ct).
B) Quantification of Ucn3 peptides in cell lysates or released in culture medium following the time course of ACh treatment (100 nM) by Elisa assay as described in materials and methods. Data represents means ± SEM. For cell lysates, * p < 0,05 vs. untreated cells (Ct) **p < 0,01 vs. untreated cells (Ct); For medium secreted Ucn3, # p < 0,05 vs. untreated cells (Ct), ## p < 0,01 vs. untreated cells (Ct).
C) Left panel: Confocal microscopy analysis of CRF2-GFP distribution in ACh- (100 nM, 5h), Ucn3- (100 nM, 5h) or ACh/Ucn3- (100 nM, 5h) treated HT-29 cells. Scale bar 20 m. Right panel: Histograms representing CRF2 endocytosis quantification using Image J software.
D) CRF2/actin protein expression levels in HT-29 cells treated or not with ACh (100 nM) quantified by western blot. Actin was used as an internal loading control. Data represents means ± SEM. *p < 0,05 vs. untreated cells (0 min), **p < 0,01 vs. untreated cells (0 min).

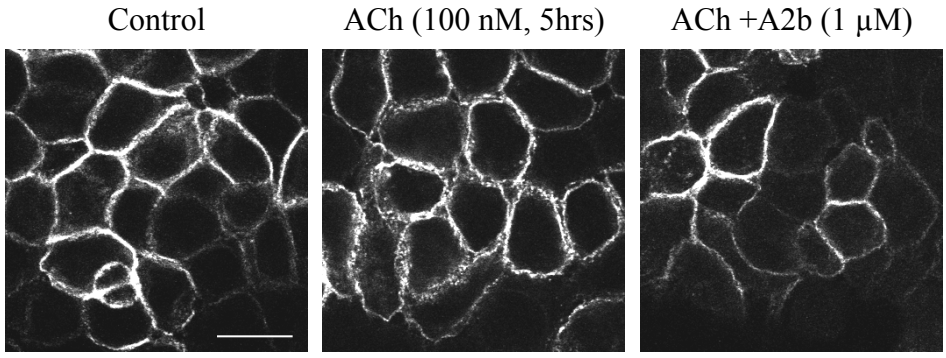
3. **Results**

3.1. Acetylcholine stimulates Ucn3 production and CRF2 activation

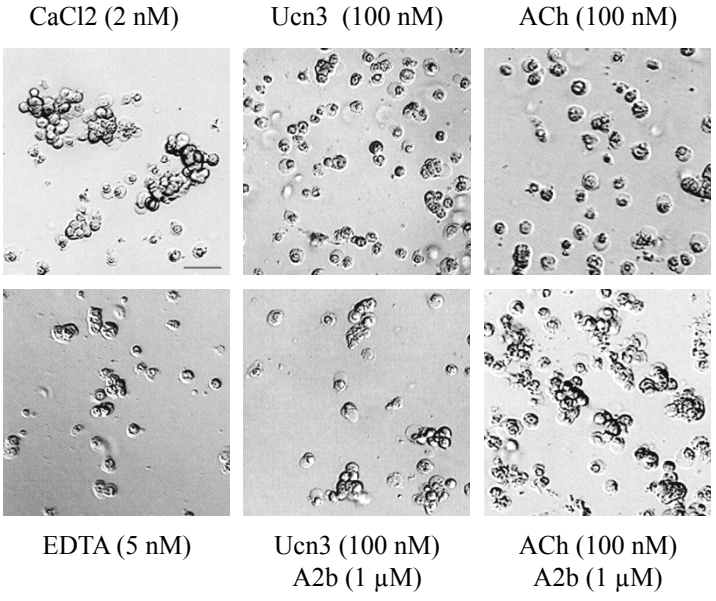
Healthy untransformed colon epithelial cells express both M1 mAChR and M3 mACHR, while only M3 mAChR is found expressed in tumorigenic colon tissues and cell lines (Frucht, Jensen, Dexter, Yang, & Xiao, 1999b; Kopp et al., 1989; O'Malley, Farrell, O'Boyle, & Baird, 1995). We previously showed that HT-29 cells express functional M3 mAChR seemingly localized at the plasma membrane (Pelissier-Rota et al., 2013). In this work we first tested the capacity of M3 mAChR signaling to regulate the CRFergic system in HT-29 cells. When treated with 100 nM ACh, HT-29 cells displayed a significant time-dependent increase in Ucn3 mRNA expression, peaking at 12 hours (4 fold increase) (Fig. 1A). This effect was correlated with the release of Ucn3 into the culture medium and the decrease of the protein level in cell lysates as measured by Elisa (Fig.2). In order to analyze the effect of ACh on the localization of CRF2, we then used a HT-29 cell line that stably overexpresses the CRF2 protein coupled to GFP tag (HT-29 CRF2-GFP cells). We observed that CRF2-GFP was predominantly localized at the plasma membrane, at the intercellular contacts (Fig. 1C, left panel). In the presence of Ucn3 (the most efficient CRF2 agonist in HT-29 cells), cell-cell adhesion was disrupted and CRF2-GFP shifted into cytoplasmic vesicles. Similarly, treatment of HT-29 cells with ACh (100 nM, 5 hours) induced the alteration of cell contacts and a reduction of membrane expression of CRF2-GFP. These effects were reinforced by simultaneous treatment of HT-29 cells with Ucn3 and ACh (Fig. 1C). These results were confirmed by the quantification of CRF2-GFP endocytosis using imageJ logiciel for fluorescent analysis (Fig. 1C, right panel). Endocytosis of GPCR receptors is a way that cells use for desensitization, and CRF receptors expression and function are regulated in the same way (Markovic, Punn, Lehnert, & Grammatopoulos, 2008). This process serves as the initial step of either receptor resensitization after recycling to the membrane, or its down-regulation by lysosomal degradation. Here, after treatment of HT-29 cells with ACh, we observed a significant decrease in CRF2 protein levels (Fig. 1D), suggesting that endocyted CRF2 were rather degraded.

Altogether these data indicate that Ach mediated M3 mAChR signaling regulates the expression and the activation of the CRFergic system in human colon cancer cells.

A)



B)



C)

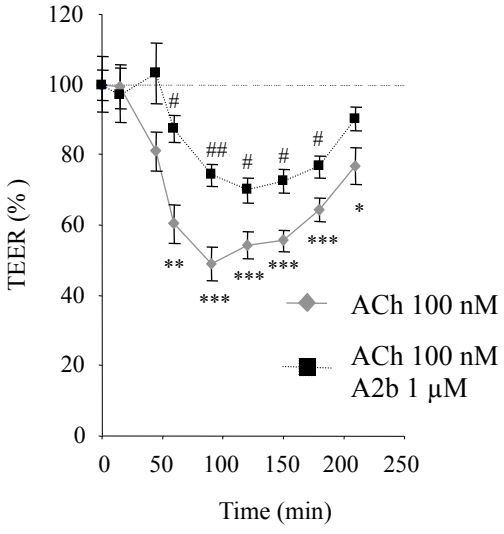


Figure 2: ACh induces cell dissociation and epithelium permeability: an effect blocked by CRF2 antagonist.
A) Confocal analysis of E-cadherin distribution in HT-29 cells pre-treated or not with the CRF2 agonist Astressin 2b (A2b 1 M) before ACh treatment. Scale bar, 30 m.
B) Effects Ucn3 and ACH (100 nM) in E-cadherin-mediated aggregation assay. While ACh and Ucn3 failed to induce HT-29 cells aggregation, pre-treatment with A2b (1 M) maintains E-cadherin aggregation in presence of CaCl2 (2 mM). Scale bar, 30 mm.
C) HT-29 cell monolayers were pre-incubated with or without A2b (1 M) overnight before addition or not of ACh (100 nM). Intercellular junctions integrity was evaluated by measuring transepithelial electrical resistance (TEER). Values are means ± SEM. *p < 0,05 vs. untreated cells (0 min), **p < 0,01 vs. untreated cells (0 min), ***p < 0,001 vs. untreated cells (0 min). # p < 0,05 A2b/ACh treated cells vs. ACh treated cells at the same time, ## p < 0,01 A2b/ACh treated cells vs. ACh treated cells at the same time.

3.2. Ach favors cell dissociation partly through CRF2 activation

We recently showed in HT-29 and Caco-2 cell lines that ACh induces an alteration of epithelial cell integrity characterized by a loss of TJ and AJ proteins subsequently to junction protein endocytosis and degradation (Pelissier-rota, Lainé, Ducarouge, Bonaz, & Jacquier-sarlin, 2013). Since ACh regulates CRF system expression and activation, a factor which also influences cell adhesion properties (Benjamin Ducarouge et al., 2013b), we examined the effects of Astressin 2b (A2b), a selective inhibitor of CRF2, on ACh-induced HT-29 intercellular dissociation. Confocal microscopy analysis showed that E-cadherin staining appears as a honeycomb like pattern at the membrane cortex (Fig. 2A). ACh treatment induced HT-29 cell-cell dissociation characterized by a global cell rounding and the concomitant disruption and thickening of the E-cadherin staining. The block of CRF2 signaling by A2b prevented these effects. Ach-mediated modulations of adhesive proprieties of HT-29 cells were also evidenced by aggregation assays (Fig. 2B), showing that in presence of Ucn3 or ACh, HT-29 cells were unable to form aggregates. However the pre-treatment of HT-29 cells with A2b allowed cell aggregation even in presence of Ucn3 and Ach.

The disruption of intercellular junctions such as tight and adherens junctions (AJ) have previously been associated to increasing paracellular permeability. While HT-29 cells do not form mature tight junctions until a complete differentiation process, we studied AJ efficiency by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) in two days confluent HT-29 cells, treated with ACh in presence or not of A2b (Fig.2 C). Ach induced a transient and statistically significant TEER decrease after 60 min that reverted within 250 min, an effect that was strongly inhibited by A2b treatment.

Taken together our data indicate that ACh signals through CRF2, probably by inducing Ucn3 release, to induce AJ destabilization and cell-cell contact dissociation. This is correlated with a functional alteration of epithelial cell permeability.

3.3 ACh-mediated intercellular junction disruption occurs via biochemical pathways including Src, Erk and PI3-kinases

Several biochemical pathways including Src, MAPK, and PI3-K modulate the dynamic rearrangement of AJ. We previously showed that CRF2 signals mainly through Src/Erk pathway to alter AJ in HT-29 cells (Benjamin Ducarouge et al., 2013b). To determine whether ACh can induce the activation of one of these signaling pathways in HT-29 cells, we used Western blot analysis to measure the effect of ACh on Src phosphorylation on Tyr^{418} and Erk phophorylation (Fig. 3A). This experiment indicates that ACh causes a transient

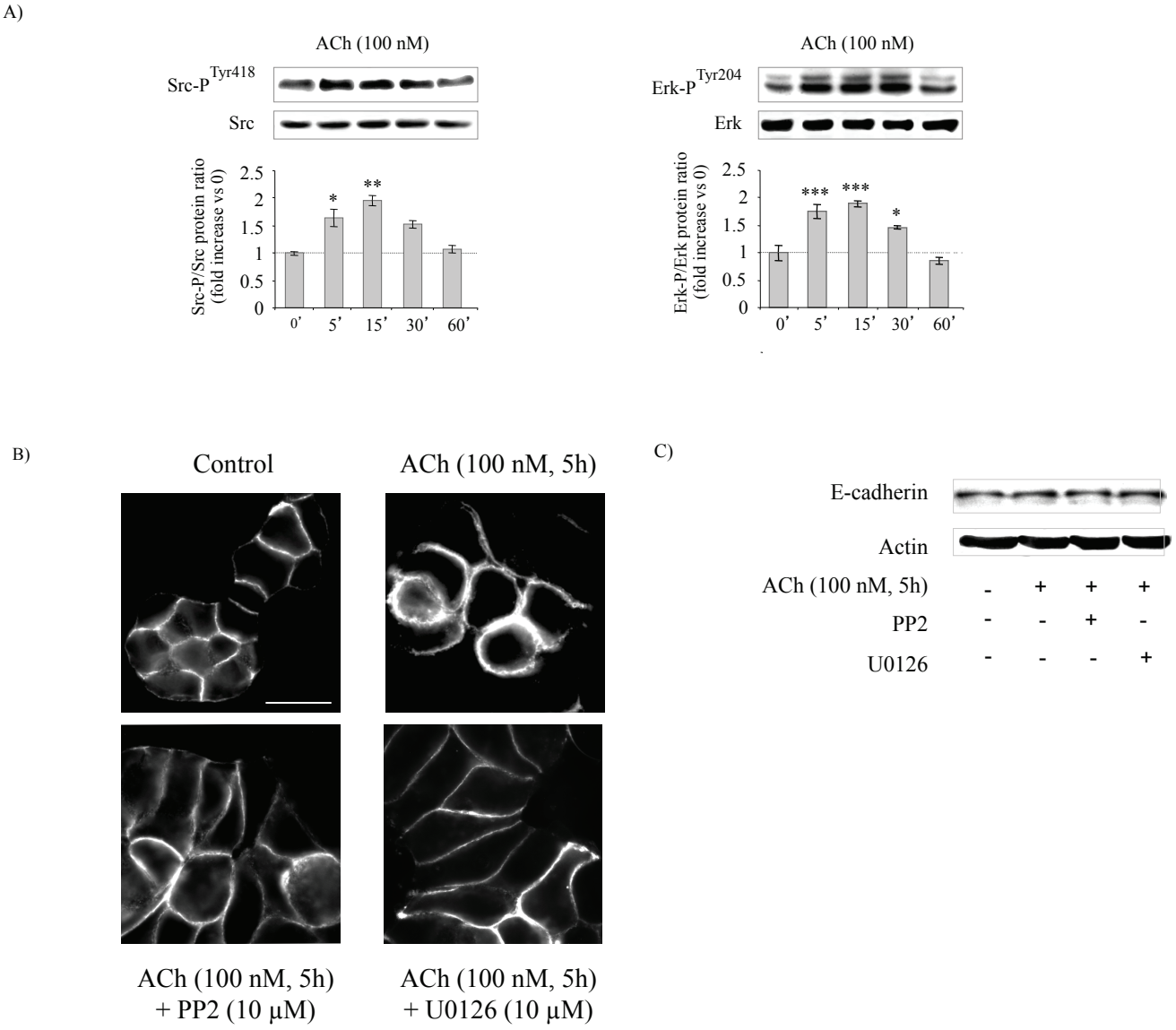


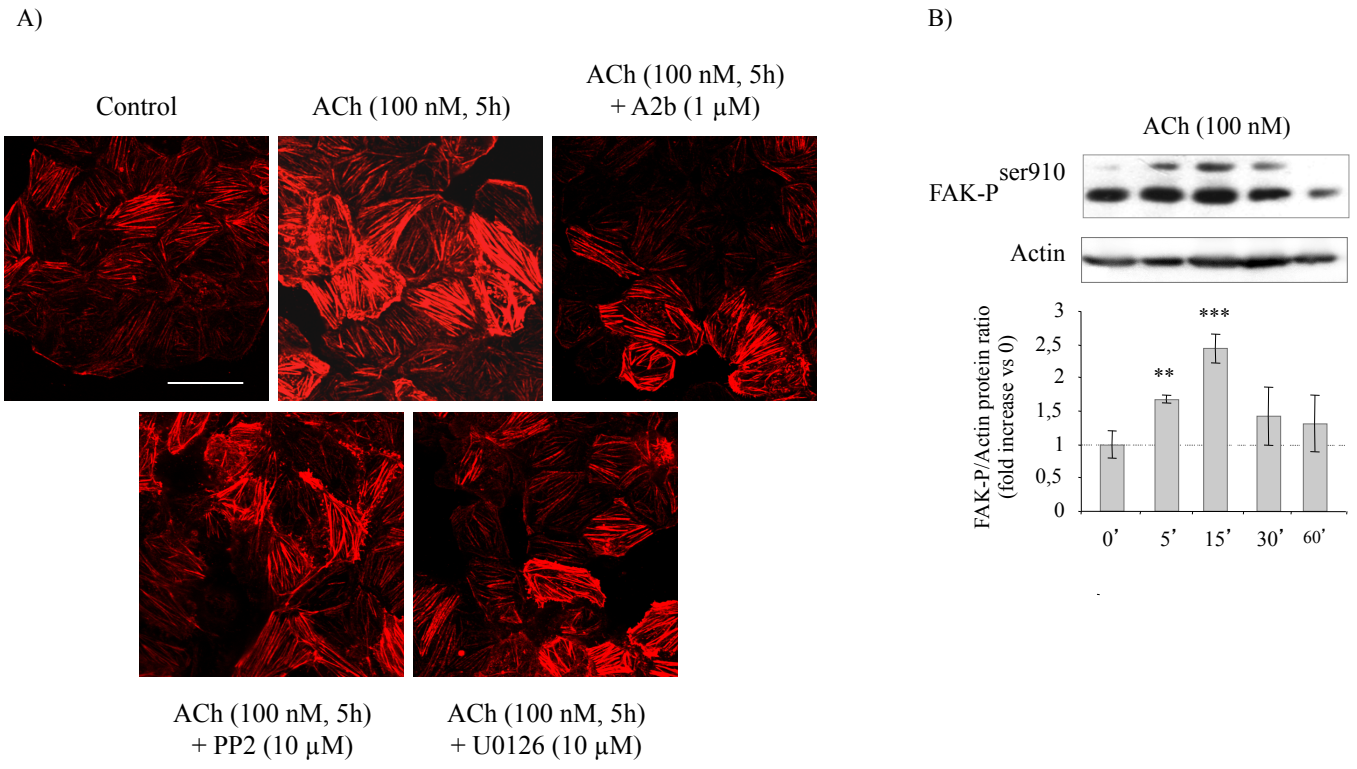
Figure 3:ACh-induced cell dissociation is dependent of Src and Erk activation.
A) Western blot analysis of Src-PTyr418, Erk-PTyr204, total Src and total Erk protein expression in HT-29 cells following the time course of ACh (100 nM) treatment. Data represents means ± SEM. *p < 0,05 vs. untreated cells. **p< 0,01 vs. untreated cells, *** p < 0,001 vs. untreated cells.
B) Confocal analysis of E-cadherin distribution in HT-29 cells treated with ACh (100 nM) in presence or not of PP2 (a Src inhibitor, 10 M 1h) or U0126 (a MERk inhibitor, 10 M 1h). Scale bar, 30 m.
C) Effect of PP2 and U0126 on E-cadherin expression in HT-29 cells treated or not with ACh (100 nM, 5h). Actin was used as an internal loading control.

phosphorylation of Src and Erk, without affecting the total Src and Erk protein levels. Activation of Src and Erk by ACh peaked at 5-15 min, with a return to basal level after 30 min. As transactivation of EGF receptors has been shown to mediate mAChR-induced activation of Erk in colon cancer cell lines (Jiang, Sinnett-Smith, & Rozengurt, 2009; Keely, Calandrella, & Barrett, 2000), we tested whether EGFR transactivation also occurs in response to ACh in HT-29 cells. In our conditions, we only observed EGFR phosphorylation in response to the positive control condition of EGF treatment, suggesting that at the concentration used ACh did not trans-activate EGFR (data not shown). Furthermore, using selective inhibitors, we found that PP2 (a Src family kinase inhibitor) and U0126 (a MEK inhibitor) were all able to abolish ACh-induced cell dissociation and E-cadherin delocalization from the membrane (Fig. 3B). Indeed, confocal microscopy analysis indicated that, in the presence of Src or Erk inhibitors, HT-29 cells still formed contacts where E-cadherin accumulated. As shown Fig. 3C, ACh rather induced a delocalization of E-cadherin than a degradation of the molecule since we observed no variation of the total E-cadherin level following ACh treatment, in presence or not of these inhibitors.

These results indicate that ACh induces cell dissociation by a signaling pathway involving Src and Erk activation.

3.4. ACh stimulates phosphorylation of FAK, a signal associated to the reorganization of actin cytoskeleton and Small G protein regulation

In HT-29 cells, we previously found that CRF2 signaling controls both cell-cell and cell-ECM adhesion. Furthermore, previous work by others indicates that ACh stimulates stress fibber formation in colon cancer cells (Belo et al., 2011; Ukegawa, Takeuchi, Kusayanagi, & Mitamura, 2003). We thus investigated the role of ACh-induced cell shape remodeling by decorating the filamentous actin cytoskeleton with phalloidin coupled to TRITC at the basal pole of HT-29 cells (Fig. 4A). In untreated cells, actin was organized as stress fibers spread across the cells. ACh-increased the formation of stress fibers as revealed by a more intense actin staining. Again, this phenomenon was abolished by A2b treatment, suggesting that CRF2 signaling is also involved in ACh-dependent regulation of atin cytoskeleton. The remodeling of actin cytoskeleton is driven partly by intracellular kinases signaling. In this line, we found that PP2 and U0126 inhibitors abolished the ACh-increased in stress fibers, indicating that ACh-mediated activation of Src and Erk participates in the reorganization actin cytoskeleton (Fig.4A). It is known that cell adhesion remodeling often involves the focal adhesion kinase (FAK) that is phosphorylated on Ser910 by the Erk kinase.



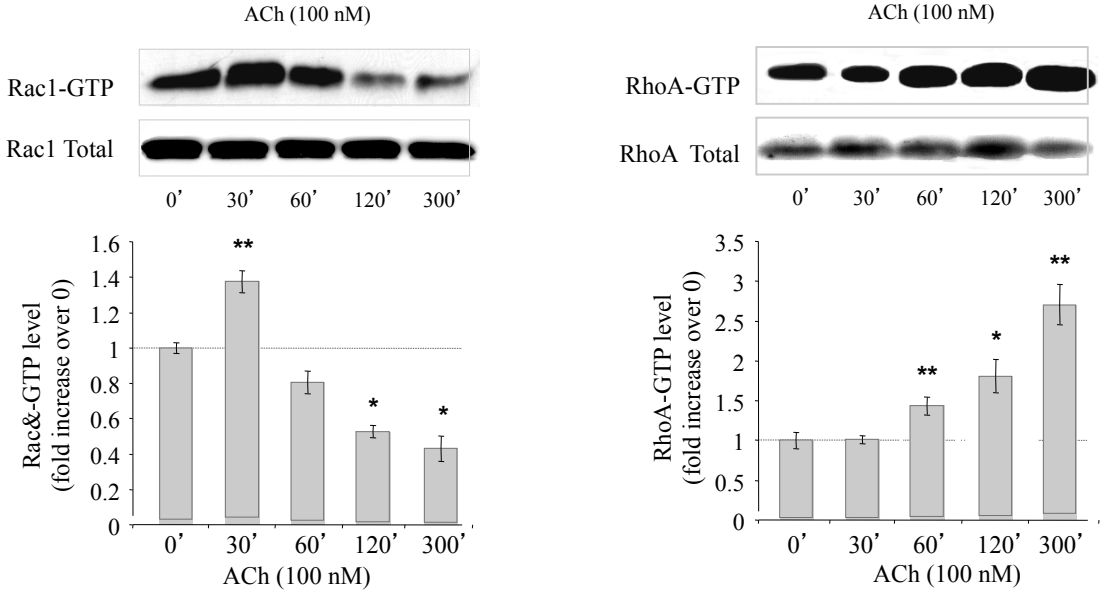


Figure 4: ACh stimulates FAK and Rho-A activation that contribute to actin cytoskeleton reorganization.
A) Phaloidin-TRITC fluorescence is analyzed by confocal microscopy at the basal pole of HT-29 cells following ACh treatment (100 nM, 5h) in presence or not of A2b, PP2 and U0126 inhibitors. Scale bar, 30 m.
B) Western blot analysis of ACh-induced FAK-PSer910 activation in HT-29 cells. Quantifications were performed from immunoblots and normalized to actin. Data represents means ± SEM. *p < 0,05 vs. untreated cells.
C) Western blots showing Rac1 (left panel) and RhoA (right panel) activities in HT-29 cells treated or not with Ach (100 nM). Quantifications were performed from immunoblots and normalized to total rac1 and total RhoA. Data represents means ± SEM. *p < 0,05 vs. untreated cells. **p< 0,01 vs. untreated cells.

We thus examined the level of FAK phosphorylation in HT-29 cell exposed to ACh (Fig. 4B). We observed that FAK-P^{Ser910} was transiently increased in response to ACh with a peak at 15 min.

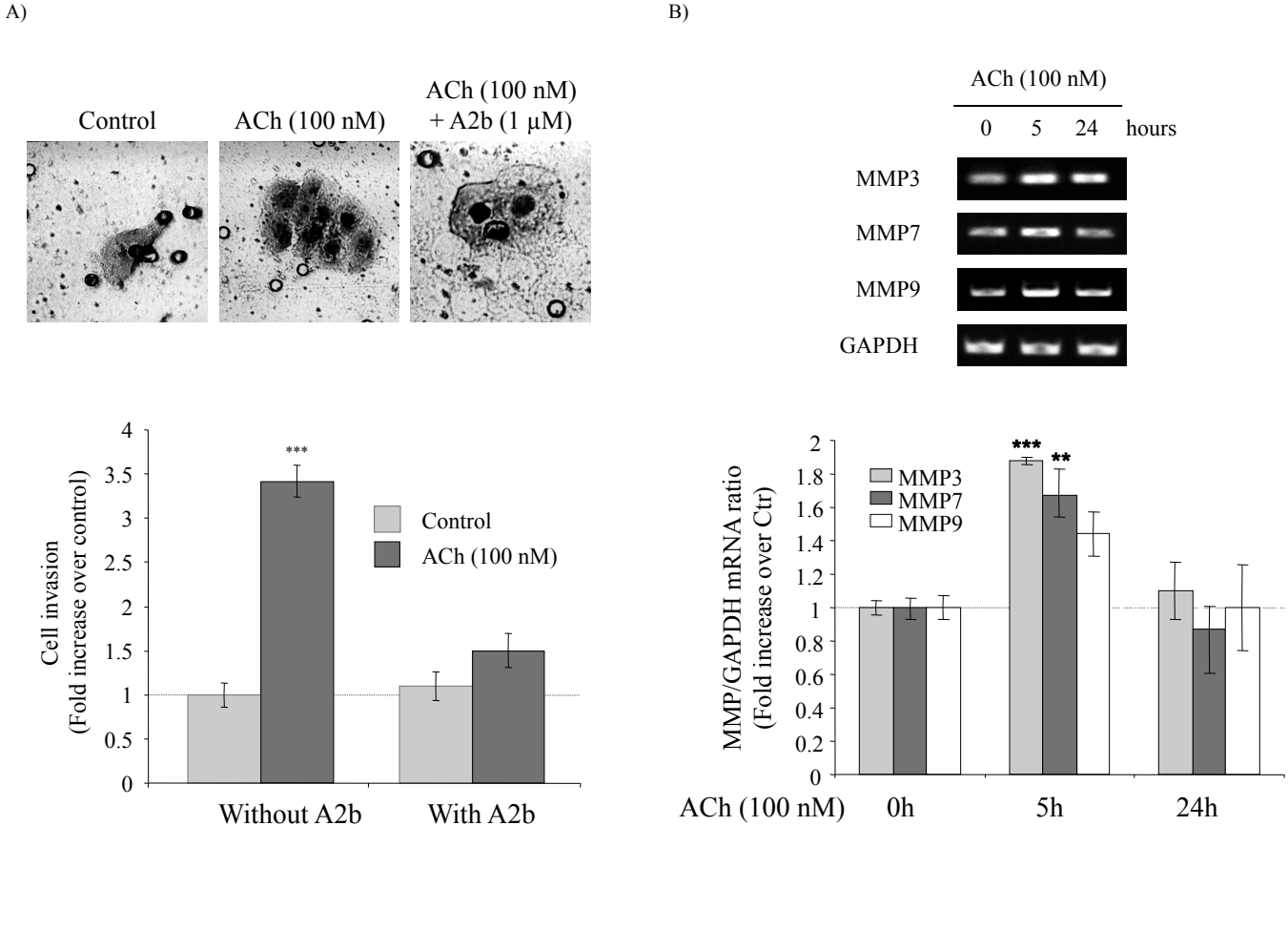
Small Rho GTPases play a major role in regulating cell morphology and actin cytoskeleton reorganization in response to external stimuli. Among these GTPases, RhoA has been described to play a key role in mAChR agonist-induced formation of actin stress fibbers and focal adhesions (FA) (Ukegawa et al., 2003). Using Rac1-GTP and RhoA-GTP pull-down assays, we compared the levels of active Rac1-GTP and RhoA-GTP in HT-29 cells according to the time of treatment with ACh (Fig. 4C). It appeared that after a transient activation of Rac1-GTP (maximal at 30 min), the level of activated Rac1 rapidly decrease under the basal level (at 120 and 300 min). In contrast, ACh stimulated time-dependent activation of RhoA that was significantly greater than baseline from 60 to 300 min. Total Rac1 and RhoA expression were not modified over the course of 5 hours incubation with ACh.

These results indicate that Ach reorganizes the actin cytoskeleton through FAK and Rho GTPAses signaling.

3.5. ACh-stimulates human colon cancer cell invasion and MMP expression

To determine whether the modification of cell-cell and cell-ECM contacts are associated to invasion, we tested the impact of ACh on HT-29 cell motility in a Matrigel assay (Fig. 5A). ACh treatment significantly increased HT-29 cell invasion compared to control. Moreover, pre-incubating HT-29 cells with A2b attenuated ACh-induced cell invasion to near basal levels. This effect was not supported by a modification of cell proliferation (data not shown), but could be regulated by the secretion of matrix metalloproteases (MMPs). As shown in Fig. 5B, mRNA levels of MMP3 and MMP7 were found to be transiently increased by ACh treatment (a peak at 5 hours). We did not observed any significant modulation of MMP9 transcripts (Fig. 5B) nor detect any MMP2 transcripts (data not shown). Next, using gelatin degradation assay, we tested the functional activities of the MMPs secreted by HT-29 cells. As shown in Fig. 5C, MMPs enzymatic activities were present in unstimulated cell line supernatants and a treatment with ACh resulted in an increase in MMP activity.

Altogether, these data indicate that ACh induced important cell adhesion remodeling. At the basal pole these changing include actin stress fibber organization that favor cell



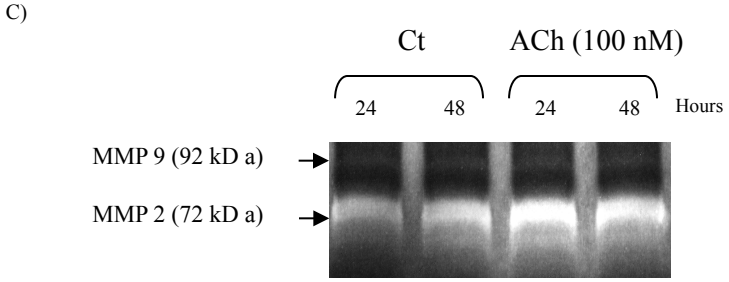


Figure 5: ACh favors CRF2-mediated HT-29 cell migration and MMPs secretion.

A) Effect of A2b (1 M) on ACh (100 nM)-induced HT-29 cell invasion. Invasion was evaluated after 48h by a matrigel assay. Cells were visualized by phase contrast microscopy and counted. Phase Images have been joined. Data represents means ± SEM. ***p < 0,001 vs. untreated cells.

B) Regulation of MMP3, MMP7 and MMP9 mRNA transcription analyzed by RT-PCR in HT-29 cells treated for 0, 5h or 24h with ACh (100 nM). Data represents means ± SEM. **p < 0,01 vs. untreated cells (0 h) and ***p < 0,001 vs. untreated cells (0 h).

C) Zymogram of gelatinolytic activities in supernatant of HT-29 cells treated or not with ACh (100 nM) during 24h and 48h.

invasion together with the expression and activation of MMP. These effects of ACh are mediated by src/Erk /FAK signaling and depend of CRF2 activation.

3.6. ACh-induces laminin 332 secretion and the activation of α3 integrin

Studies of laminin 332 (LN332) expression in various human cancers indicated that this protein (a major component of colon's basal lamina) was invariably associated with budding cancer cells located at the invasive front of malignant epithelia (Pyke et al., 1995). We thus investigated the potential links between ACh and LN332 in the regulation of HT-29 cell invasion. For this purpose, we first analyzed the levels of LN332 deposited into insoluble matrix from HT-29 cells treated or not with ACh (Fig 6 A). Immunochemical detection of LN332 deposited on the culture well by HT-29 cells showed only tiny dispersed spots. In contrast, when HT-29 cells were treated with Ucn3 or ACh, LN332 was strongly labeled and displayed in basal patches (Fig. 6A). This differential expression of LN332 in HT-29 cells following treatment with Ucn3 and ACh was confirmed using a quantitative solid phase assay (Fig. 6B). We next investigated if this remodeling of ECM characterized by increasing deposit of LN332 could affect cell-ECM adhesion proprieties. First, we performed cell adhesion experiments on LN332 (Fig. 6C). ACh pre-treatment for 24 hours significantly increased HT-29 cell adhesion on LN332 after 60 min of plating. Moreover, A2b pre-incubation abolished ACh-stimulated adhesion to LN332 (Fig. 6C). To determine the contribution of integrin-mediated adhesion to LN332, we performed adhesion assays to LN332 in presence of blocking function antibodies directed against specific integrins (Fig. 6D). Although HT-29 cells adhesion to LN332 was mediated by both α3 and α6 integrin (42% and 61% inhibition respectively, Fig. 6D, upper panel), the adhesion of HT-29 cells treated with ACh was mostly dependent of α3β1 integrins (80% inhibition; Fig. 6D, lower panel).

To investigate whether the differences in adhesion to LN332 between HT-29 cells treated or not with ACh could result from changes in the expression of integrin α3, the protein expression was analyzed by western blot (Fig. 6E). No significant changes in the levels of integrin α3 were found, indicating that ACh did not modify integrin expression. However confocal microscopy analysis of integrin α3β1 cellular distribution indicated that while this integrin is mostly localized at the cell membrane in cell-cell contacts in HT-29 cells, ACh treatment induced its delocalization into distinct cytoplasmic loci (Fig. 6F).

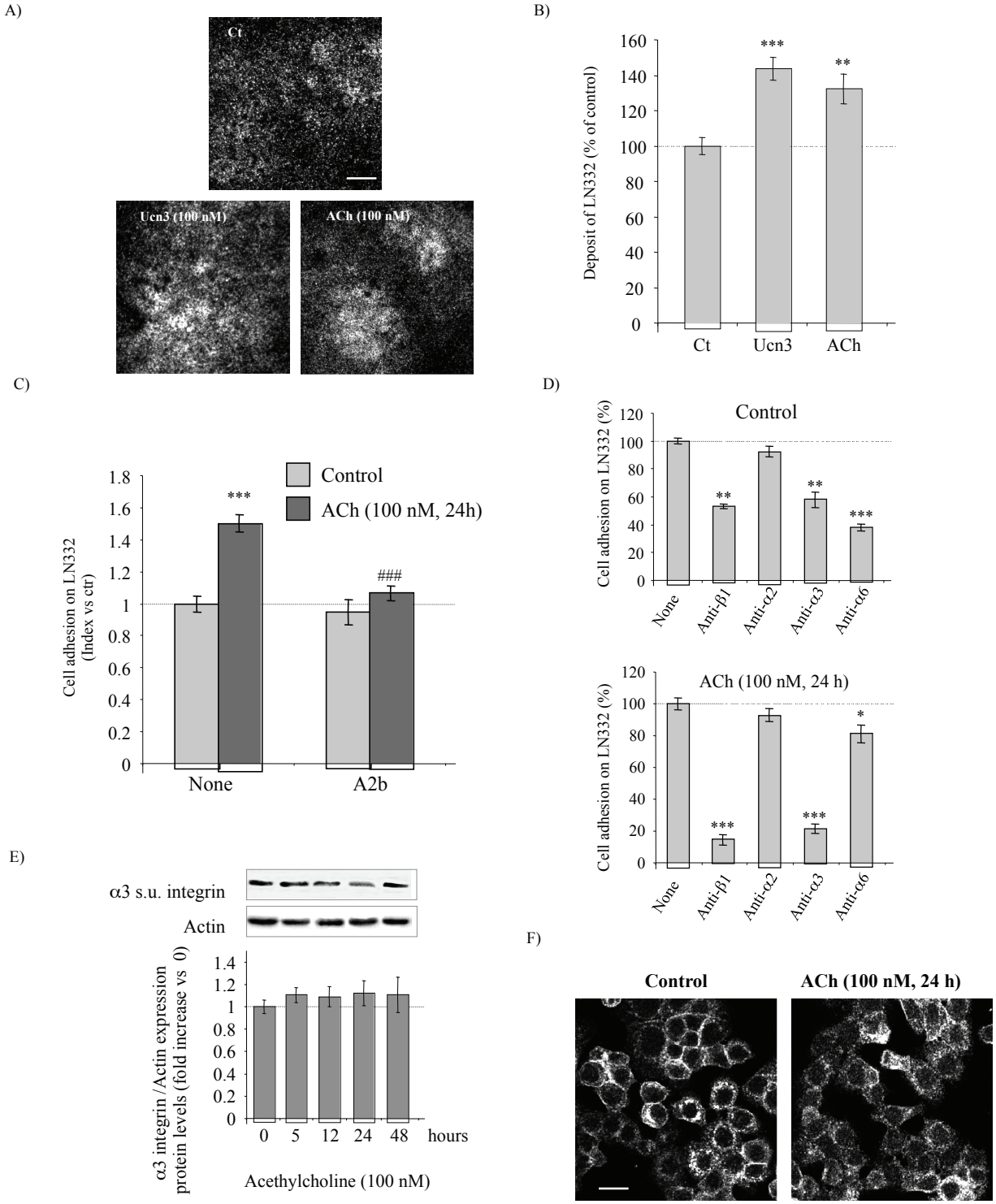


Figure 6: Laminin332-mediated activation of 3 1 integrin in response to ACh, stimulates cell adhesion.

A) Immunodetection of secreted laminin332 (LN332) by HT-29 cells treated for 24 h post-confluent with ACh (100 nM) and Ucn3 (100 nM). Scale bar, 30 m.

B) Quantification, in a solid phase assay of LN332 secretion into insoluble form by HT-29 cells following treatment with Ucn3 (100 nM, 24h) or ACh (100 nM, 24h).

C) HT-29 cells were treated or not with ACh (100 nM) in presence or not of A2b (1 m) during 24h and then plated on LN332. Cell-ECM adhesion was evaluated at 60 min with the use of a Cell Titer Aqueous MTT reagent kit. Values are normalized to the adhesion without ACh. Data represents means ± SEM. ***p < 0,001 vs. untreated cells and ###p < 0,001 HT-29 cells treated with ACH and A2b vs. HT-29 cells only treated with ACh.

D) Before adhesion to LN332, HT-29 cells treated or not with ACh (100 nM, 24h) were incubated for 45 min with various mAbs directed against integrin subunits at a concentration of 10 g/mL: PAC10 (anti- 1), BHA2.1 (anti- 2), P1B5 (anti- 3) and GoH3 (anti- 6).

E) Western blot analysis of 3 integrin protein expression in HT-29 cells following the time course of ACh treatment.

F) Immunofluorescence analysis of 3 integrin protein expression in HT-29 cells following ACh (100 nM, 24h). Scale bar, 20 m. Quantifications were performed from immunoblots and normalized to actin. Data represents means ± SEM.

It thus appears that following treatment with ACh, HT-29 cells produce LN332 that in turn may activate α3β1 integrins. This activation correlates with the cellular redistribution of α3β1 integrins and favors together both HT-29 cell adhesion to LN332 and invasion.

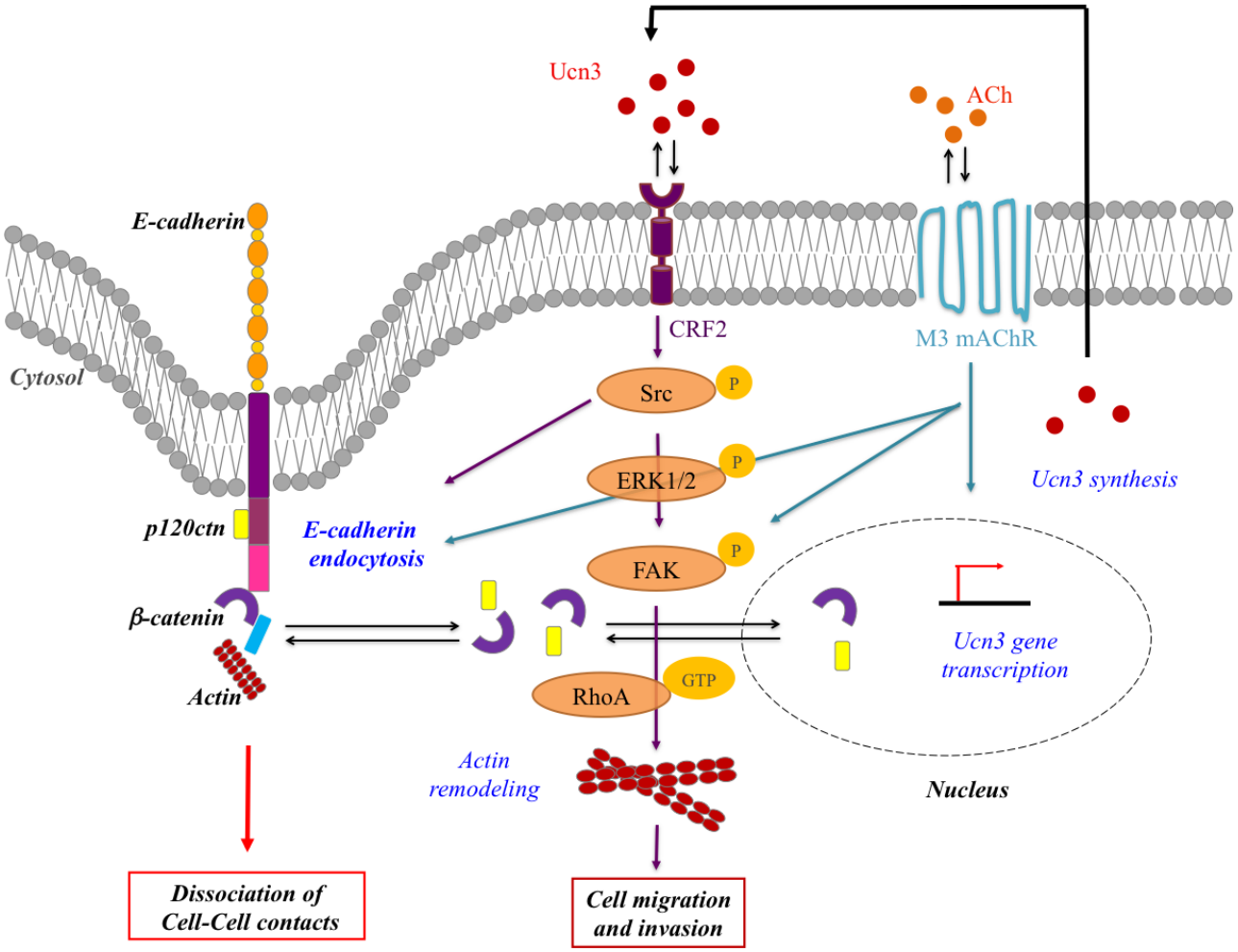


Figure 7: The proposed scheme of CRF2 and mAChR crosstalk in cancer colon cells.
ACh interaction with mACh stimulates Ucn3 synthesis and secretion. Then Ucn3 activates CRF2 signaling through Src/Erk pathway to induce cell-cell contacts dissociation (E-cadherin endocytosis) but also cell-ECM remodeling in favor of cell migration and invasion. In response to FAK-mediated RhoA activation, actin cytoskeleton is reorganized, and ACh-induced production of Laminin332 activates a3b1 integrins. Both contribute to ACh-induced migration. This new intercellular circuit relaying M3 mAChR to CRF2 that could mediate colonic mucosal barrier dysfunction may constitute an important component of the pro-inflammatory and pro-tumoral processes involved in IBD and CRC pathology development respectively.

4. Discussion

Several agonists such as neuromodulators, ACh and immunize cell mediators act at GPCR within the intestinal mucosa to induce intracellular signaling pathway that alter epithelial cell function. The main finding presented here is that ACh-mediated activation of mAChR regulates CRF2 signaling. The latter occurs through the synthesis and release of Ucn3. Activation of these GPCR stimulates Src/Erk/Fak and RhoA pathways resulting in the remodeling of cell adhesion complexes and actin cytoskeleton that stimulates cell migration and invasion. The proposed scheme of muscarinic and CRF receptors cross-talk is presented in Fig. 7.

4.1 Crosstalk between CRF and cholinergic systems

First evidences for a crosstalk between stress and muscarinic receptors came from pioneers experiments in Wistar-Kyoto rats, which are a weak acetylcholinesterase activity and a more stress susceptibility compared to the parent Wistar strain (P. R. Saunders, Hanssen, & Perdue, 1997). This, and the fact that atropine (considered to act only at the periphery) can prevent stress-induced epithelial, suggest the involvement of peripheral muscarinic mechanism in the epithelial tightness (GROOT et al., 2006; Kiliaan et al., 1998; J Santos et al., 1999). More recently it has been proposed that psychological stress-induced barrier dysfunction was dependent on the release of ACh by enteric nerves following CRF2 activation (Demaude et al., 2009; Gareau et al., 2007). These data indicate that the CRF system can control changes in local ACh level. Furthermore, in co-culture studies, carbachol activation of eosinophils caused production of CRF and activation of mast cells, which increased permeability of T84 epithelial cells to macromolecules (Wallon et al., 2011).

In this work, we demonstrated for the first time that ACh might inversely control CRF2 ligand synthesis and release, resulting in CRF2 signaling in epithelial cells. It is clearly admit that non-neuronal cells, such as epithelial cells, can produce ACh as an autocrine/paracrine growth factor stimulating proliferation (Cheng et al., 2008). Multiple mechanisms in colon cancer cells can modulate extracellular ACh concentration based on the regulation of ACh production by Choline acetyltransferase (ChAT) (regulation of expression and activity), ACh release (intracellular transport and exocytosis), and ACh hydrolysis by (AChE expression and activity). Regulation of these mechanisms varies between normal and cancerous colon. In colon cancer, it has been reported that both AChE activity is decreased (Montenegro et al., 2014) while ChAT expression is increased (Cheng et al., 2008). AChE

activity is predominantly localized to the apical membrane of Caco-2 cells (Plageman, Pauletti, & Skau, 2002). So colon cancer cells or enterocytes release AChE into the extracellular space and AChE may represent an "Off" mechanism whereby colon cells rapidly hydrolyzed ACh after its release from the apical pole.

4.2. Signaling pathways induce by ACh-mediated transactivation of CRF2

Using human colon cancer cell lines, we previously showed that ACh alters the assembly of intercellular junctions (AJ and TJ), a process associated to epithelial barrier failure (Pelissier-Rota et al., 2013). This correlates with the observation that mAChR (in particular M3) increases epithelial cell permeability (Cameron & Perdue, 2007), but in our study, this effect is blocked by Astressin 2b a CRF2 inhibitor, thereby indicating a role for CRF2 in this process. ACh as well as Ucn3- mediated AJ disassembly is transient and reversible. The phosphorylation of adhesion molecules plays an important role in assembly/disassembly of intercellular junctions controlling their structural integrity and their adhesive capacity (Alemà & Salvatore, 2007; Lilien, Balsamo, Arregui, & Xu, 2002; Pece & Gutkind, 2002; Serres et al., 1997; Volberg et al., 1992). Various kinases have been described to phosphorylate AJ proteins, among which the Src kinase (Kourtidis, Ngok, & Anastasiadis, 2013; Mariner et al., 2001). We found that ACh as well as Ucn3 induces Src phosphorylation on Tyr 418 in HT-29 cells and that PP2, a Src inhibitor, abolished the effects.

ACh-mediated transactivation of CRF2 also leads to the remodeling of cell-ECM adhesion, actin cytoskeleton and stimulates migration and invasion of HT-29 cells. It was previously described that mAChR activation stimulates migration and invasion of human colon cancer cells (Belo et al., 2011; Raufman, Cheng, et al., 2011). In these cases, the transactivation of EGFR mediates the effect of M3 mAChR. ACh binding to M3 mAChR results in MMP activation (MMP1 or MMP7) that releases EGFR ligand named HBEGF (Cheng, Xie, & Raufman, 2007; Xie, Cheng, Shant, & Raufman, 2009). The downstream signaling involves ERK and PI3-K dependent RhoA activation as well as FAK activation (Belo et al., 2011; Calandrella, Barrett, & Keely, 2005). We also found that ACh induces ERK and FAK phosphorylation together with Rho-A activation. However, in our experiments we didn't observe any activation of EGFR as determined by EGFR phosphorylation (data not shown), and the ACh-mediated effect on cell-ECM adhesion and invasion are blocked by A2b suggesting that transactivation through CRF2 rather than through EGFR occurred. This discrepancy could be explained on one hand by the concentration of ACh used. Indeed we worked with nM range of ACh (a concentration in favor of CRF2 transactivation) whereas

Raufman'group used μM (a concentration in favor of EGFR transactivation). Colon cancer cell lines release in the range of 3 to 7 μM of ACh, a concentration favorable to transactivation of EGFR, while HT-29, that do not express CHAT, do not release detectable ACh (Cheng et al., 2008). On the other hand, ACh-mediated effects could be dependent of CRF2 and EGFR distribution and expression on the cell membrane. CRF2 have been described to be at the apical side as well as to the basolateral membranes (Chatzaki et al., 2004; Moss et al., 2007). The exact cellular locations of mAChR in the human intestinal epithelial cells are still not fully elucidated. Functional and mRNA data previously suggested M3 receptors are located in human colonic cell lines and isolated crypts (Lindqvist et al., 2002; Yang & Frucht, 2000).

Another important finding is the mechanism by which ACh could regulate cellular-MEC interactions. We found that long-term exposition to ACh can stimulate LN332 deposit, that is a strong receptor for α3β1 integrin (Rousselle, Lunstrum, Keene, & Burgeson, 1991) and contribute to its activation (Gout et al., 2001). The globular module G3 of LNα3 -chain is required for this activation and for rapid cell adhesion and migration (Tsubota et al., 2000). Immunofluorescence experiments suggest that α3β1 integrin can localize to both cell-cell contacts and focal contacts (Carter, Kaur, Gil, Gahr, & Wayner, 1990; Sriramarao, Steffner, & Gehlsen, 1993). Indeed, in polarized cells, α3β1 has been implicated in homophilic interactions in cell-cell adhesion (Sriramarao et al., 1993). We found that in absence of ACh, α3β1 was effectively distributed in cell-cell contacts, whereas it leaves the membrane for a more diffuse cellular distribution following ACh treatment. This phenomenon could be a consequence of ACh-induced cell dissociation. Furthermore, LN332 deposit may favor focal contacts involving α3β1, which would explain the increased ability of ACh-treated HT-29 cells to adhere to LN332. The α3β1-dependent migration on LN332 could be relevant in inflammation processes such as the restitution of inflamed epithelium but also during tumor invasion. In colon adenocarcinomas, the LN332 staining was invariably associated with budding cancer cells located at the invasive front of malignant epithelium (Pyke et al., 1995).

4.3 Physiological relevance of stress and cholinergic system crosstalk

In both health and disease, it is likely that autocrine and paracrine signaling by nonneuronal ACh play an important role in modulating cell function (Grando, Kist, Qi, & Dahl, 1993; Song et al., 2003; Tobin, Giglio, & Lundgren, 2009). Taken together our data suggests the possibility that CRF2 acts as the signaling compound for ACh-induced cell

permeability in epithelium cell in the pathogenesis of IBD. However, such ACh release following Vagal Nerve Stimulation (VNS) may represent a danger if patients express mAChR. The nature and the subtype of cholinergic receptors on target cells should thus be carefully investigated.

Co-expression of M3 mAChR, CRF2 and EGFR in many colon cancer cell lines associated with overexpression of these receptors in the majority of colon cancer suggests that the functional interaction between M3 mAChR and EGFR on one hand and M3 mAChR and CRF2 on the other hand are important for colon cancer regulation and tumor promotion. Using different *in vivo* models, Raufman *et al.*, showed that *M3 mAChR* gene ablation decreases both colon tumor number and size and the degree of dysplasia (Raufman et al., 2008b). Indeed, only low-grade adenomas are detected from *Apc* $^{min/+}$ M3AChR $^{-/-}$ mice while in *Apc* $^{min/+}$ M3AChR $^{+/+}$ mice, both low and high grade adenomas are observed (Raufman, Shant, et al., 2011).

In conclusion, the data presented here highlight a new intercellular circuit relaying M3 mAChR to CRF2 that could mediate colonic mucosal barrier dysfunction in IBD patients. This circuit might exacerbate mucosal inflammation therefore increasing the risk of CCR.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, GEFLUC and ESPOIR. M. Pelissier-Rota are the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

References

Alemà, S., & Salvatore, A. M. (2007). p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(1), 47–58. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.06.001

Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*, 525–57. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410

Belo, A., Cheng, K., Chahdi, A., Shant, J., Xie, G., Khurana, S., & Raufman, J.-P. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *300*(5), G749–60. doi:10.1152/ajpgi.00306.2010

Bonaz, B., Picq, C., Sinniger, V., Mayol, J. F., & Clarençon, D. (2013). Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *25*(3), 208–221. doi:10.1111/nmo.12076

Borovikova, L. V, Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M., & Tracey, K. J. (2000). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, *85*(1-3), 141–147. doi:10.1016/S1566-0702(00)00233-2

Calandrella, S. O., Barrett, K. E., & Keely, S. J. (2005). Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates muscarinic stimulation of focal adhesion kinase in intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, *203*(1), 103–10. doi:10.1002/jcp.20190

Cameron, H. L., & Perdue, M. H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro.

Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society, *19*(1), 47–56. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x

Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J., & Wayner, E. A. (1990). Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *The Journal of Cell Biology*, *111*(6 Pt 2), 3141–54.

Chartier, N. T., Lainé, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. a, Matos, P., … Jacquier-Sarlin, M. R. (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 1), 31–46. doi:10.1242/jcs.02698

Chatzaki, E., Crowe, P. D., Wang, L., Million, M., Taché, Y., & Grigoriadis, D. E. (2004). CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *Journal of Neurochemistry*, *90*(2), 309–16. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02490.x

Cheng, K., Samimi, R., Xie, G., Shant, J., Drachenberg, C., Wade, M., … Raufman, J.-P. (2008). Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(3), G591–7. doi:10.1152/ajpgi.00055.2008

Cheng, K., Xie, G., & Raufman, J.-P. (2007). Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholyltaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. *Biochemical Pharmacology*, *73*(7), 1001–12. doi:10.1016/j.bcp.2006.11.028

Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sciences*, *84*(23-24), 847–52. doi:10.1016/j.lfs.2009.03.016

Ducarouge, B. (2011). Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier : Link to inflammation and cancer, *1*(Figure 1).

Ducarouge, B., Pelissier-Rota, M., Lainé, M., Cristina, N., Vachez, Y., Scoazec, J.-Y., … Jacquier-Sarlin, M. (2013a). CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. *PloS One*, *8*(11), e79335. doi:10.1371/journal.pone.0079335

Ducarouge, B., Pelissier-Rota, M., Lainé, M., Cristina, N., Vachez, Y., Scoazec, J.-Y., … Jacquier-Sarlin, M. (2013b). CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. *PloS One*, *8*(11), e79335. doi:10.1371/journal.pone.0079335

Feagins, L. A., Souza, R. F., & Spechler, S. J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *6*(5), 297–305. doi:10.1038/nrgastro.2009.44

Fries, W., Mazzon, E., Squarzoni, S., Martin, A., Martines, D., Micali, A., … Longo, G. (1999). Experimental colitis increases small intestine permeability in the rat. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *79*(1), 49–57.

Frucht, H., Jensen, R. T., Dexter, D., Yang, W. L., & Xiao, Y. (1999a). Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *5*(9), 2532–2539.

Frucht, H., Jensen, R. T., Dexter, D., Yang, W. L., & Xiao, Y. (1999b). Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *5*(9), 2532–9.

Gareau, M. G., Jury, J., & Perdue, M. H. (2007). Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *293*(1), G198–203. doi:10.1152/ajpgi.00392.2006

Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, *131*(4), 1122–30. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.016

Gout, S. P., Jacquier-Sarlin, M. R., Rouard-Talbot, L., Rousselle, P., & Block, M. R. (2001). RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(10), 3268–81.

Grando, S. A., Kist, D. A., Qi, M., & Dahl, M. V. (1993). Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *The Journal of Investigative Dermatology*, *101*(1), 32–6.

GROOT, J., BIJLSMA, P., KALKEREN, A. VAN, KILIAAN, A., SAUNDERS, P., & PERDUE, M. (2006). Stress-Induced Decrease of the Intestinal Barrier Function: The Role of Muscarinic Receptor Activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *915*(1), 237–246. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05247.x

Hisamatsu, T., Inoue, N., Yajima, T., Izumiya, M., Ichikawa, H., & Hibi, T. (2007). Psychological aspects of inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, *42 Suppl 1*, 34–40. doi:10.1007/s00535-006-1937-4

Jankowski, J. A., Bedford, F. K., & Kim, Y. S. (1997). Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *57*, 187–215.

Jiang, X., Sinnett-Smith, J., & Rozengurt, E. (2009). Carbachol induces p70S6K1 activation through an ERK-dependent but Akt-independent pathway in human colonic epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *387*(3), 521–4. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.060

Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., & Chatzaki, E. (2010). The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *67*(8), 1293–306. doi:10.1007/s00018-010-0265-2

Keely, S. J., Calandrella, S. O., & Barrett, K. E. (2000). Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular ca(2+), PYK-2, and p60(src). *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(17), 12619–25.

Kiliaan, A. J., Saunders, P. R., Bijlsma, P. B., Berin, M. C., Taminiau, J. A., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *The American Journal of Physiology*, *275*(5 Pt 1), G1037–44.

Kopp, R., Lambrecht, G., Mutschler, E., Moser, U., Tacke, R., & Pfeiffer, A. (1989). Human HT-29 colon carcinoma cells contain muscarinic M3 receptors coupled to phosphoinositide metabolism. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, *172*(4-5), 397–405. doi:10.1016/0922-4106(89)90021-7

Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *116*, 409–32. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2

Larauche, M., Kiank, C., & Tache, Y. (2009). Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *60 Suppl 7*, 33–46.

Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., & Xu, G. (2002). Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *224*(1), 18–29. doi:10.1002/dvdy.10087

Lindqvist, S., Hernon, J., Sharp, P., Johns, N., Addison, S., Watson, M., … Williams, M. (2002). The colon-selective spasmolytic otilonium bromide inhibits muscarinic M(3) receptor-coupled calcium signals in isolated human colonic crypts. *British Journal of Pharmacology*, *137*(7), 1134–42. doi:10.1038/sj.bjp.0704942

Lu, W., & Mayer, B. J. (1999). Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization. *Oncogene*, *18*(3), 797–806. doi:10.1038/sj.onc.1202361

Marin, M. L., Geller, S. A., Greenstein, A. J., Marin, R. H., Gordon, R. E., & Aufses, A. H. (1983). Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies. *The American Journal of Gastroenterology*, *78*(6), 355–64.

Mariner, D. J., Anastasiadis, P., Keilhack, H., Böhmer, F. D., Wang, J., & Reynolds, A. B. (2001). Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28006–13. doi:10.1074/jbc.M102443200

Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., & Grammatopoulos, D. K. (2008). Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *22*(3), 689–706. doi:10.1210/me.2007-0136

Maunder, R. G., & Levenstein, S. (2008). The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Current Molecular Medicine*, *8*(4), 247–52.

Mawdsley, J. E., & Rampton, D. S. (2006). The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation*, *13*(5-6), 327–36. doi:10.1159/000104861

Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, a, Mouret, C., Sinniger, V., … Bonaz, B. (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, *160*(1-2), 82–9. doi:10.1016/j.autneu.2010.10.007

Montenegro, M. F., Nieto-Cerón, S., Cabezas-Herrera, J., Muñoz-Delgado, E., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (2014). Most acetylcholinesterase activity of non-nervous tissues and cells arises from the AChE-H transcript. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, *53*(3), 429–35. doi:10.1007/s12031-013-0172-8

Moss, A. C., Anton, P., Savidge, T., Newman, P., Cheifetz, A. S., Gay, J., … Pothoulakis, C. (2007). Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha. *Gut*, *56*(9), 1210–7. doi:10.1136/gut.2006.110668

Nys, K., Agostinis, P., & Vermeire, S. (2013). Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *10*(7), 395–401. doi:10.1038/nrgastro.2013.66

O'Malley, K. E., Farrell, C. B., O'Boyle, K. M., & Baird, A. W. (1995). Cholinergic activation of Cl- secretion in rat colonic epithelia. *European Journal of Pharmacology*, *275*(1), 83–9.

Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2006). Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions*, *34*(Pt 6), 1037–40. doi:10.1042/BST0341037

Pece, S., & Gutkind, J. S. (2002). E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nature Cell Biology*, *4*(4), E72–4. doi:10.1038/ncb0402-e72

Pelissier-rota, M., Lainé, M., Ducarouge, B., Bonaz, B., & Jacquier-sarlin, M. (2013). Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer : Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation ?, *2013*(August), 1116–1131.

Pelissier-Rota, M., Lainé, M., Ducarouge, B., Bonaz, B., & Jacquier-Sarlin, M. (2013). Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer: Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation? *Journal of Cancer Therapy*, *04*(06), 1116–1131. doi:10.4236/jct.2013.46128

Plageman, L. R., Pauletti, G. M., & Skau, K. A. (2002). Characterization of acetylcholinesterase in Caco-2 cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *227*(7), 480–6.

Pyke, C., Salo, S., Ralfkiaer, E., Rømer, J., Danø, K., & Tryggvason, K. (1995). Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Research*, *55*(18), 4132–9.

Radford-Smith, G., & Jewell, D. P. (1996). Cytokines and inflammatory bowel disease. *Baillière's Clinical Gastroenterology*, *10*(1), 151–64.

Rao, R., Baker, R. D., & Baker, S. S. (1999). Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. *Biochemical Pharmacology*, *57*(6), 685–95.

Raufman, J.-P., Cheng, K., Saxena, N., Chahdi, A., Belo, A., Khurana, S., & Xie, G. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate matrix metalloproteinase 1-dependent invasion of human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *415*(2), 319–324. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.052

Raufman, J.-P., Samimi, R., Shah, N., Khurana, S., Shant, J., Drachenberg, C., … Cheng, K. (2008a). Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. *Cancer Research*, *68*(10), 3573–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6810

Raufman, J.-P., Samimi, R., Shah, N., Khurana, S., Shant, J., Drachenberg, C., … Cheng, K. (2008b). Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. *Cancer Research*, *68*(10), 3573–3578. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6810

Raufman, J.-P., Shant, J., Xie, G., Cheng, K., Gao, X.-M., Shiu, B., … Khurana, S. (2011). Muscarinic receptor subtype-3 gene ablation and scopolamine butylbromide treatment attenuate small intestinal neoplasia in Apcmin/+ mice. *Carcinogenesis*, *32*(9), 1396–1402. doi:10.1093/carcin/bgr118

Ren, X. D., Kiosses, W. B., & Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO Journal*, *18*(3), 578–85. doi:10.1093/emboj/18.3.578

Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R., & Burgeson, R. E. (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *The Journal of Cell Biology*, *114*(3), 567–76.

Sansone, P., Piazzi, G., Paterini, P., Strillacci, A., Ceccarelli, C., Minni, F., … Bonafè, M. (2009). Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(9B), 3876–3887. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00580.x

Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1999). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *The American Journal of Physiology*, *277*(2 Pt 1), G391–9.

Santos, J., Yates, D., Guilarte, M., Vicario, M., Alonso, C., & Perdue, M. H. (2008). Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(9), 1248–56. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.07.002

Saunders, P. R., Hanssen, N. P., & Perdue, M. H. (1997). Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *273*(2), G486–490.

Saunders, P. R., Santos, J., Hanssen, N. P. M., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (2002). Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Digestive Diseases and Sciences*, *47*(1), 208–15.

Scharl, M., & Rogler, G. (2012). Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? *Current Opinion in Gastroenterology*, *28*(4), 301–9. doi:10.1097/MOG.0b013e328353e61e

Serres, M., Grangeasse, C., Haftek, M., Durocher, Y., Duclos, B., & Schmitt, D. (1997). Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Experimental Cell Research*, *231*(1), 163–72. doi:10.1006/excr.1996.3443

Song, P., Sekhon, H. S., Jia, Y., Keller, J. A., Blusztajn, J. K., Mark, G. P., & Spindel, E. R. (2003). Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, *63*(1), 214–221.

Sriramarao, P., Steffner, P., & Gehlsen, K. R. (1993). Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(29), 22036–41.

Tobin, G., Giglio, D., & Lundgren, O. (2009). Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *60*(1), 3–21.

Tsubota, Y., Mizushima, H., Hirosaki, T., Higashi, S., Yasumitsu, H., & Miyazaki, K. (2000). Isolation and activity of proteolytic fragment of laminin-5 alpha3 chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *278*(3), 614–20. doi:10.1006/bbrc.2000.3851

Ukegawa, J.-I., Takeuchi, Y., Kusayanagi, S., & Mitamura, K. (2003). Growth-promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *129*(5), 272–8. doi:10.1007/s00432-003-0433-y

Volberg, T., Zick, Y., Dror, R., Sabanay, I., Gilon, C., Levitzki, A., & Geiger, B. (1992). The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *The EMBO Journal*, *11*(5), 1733–42.

Von Rosenvinge, E. C., & Raufman, J.-P. (2011). Muscarinic receptor signaling in colon cancer. *Cancers*, *3*(1), 971–981. doi:10.3390/cancers3010971

Wallon, C., Persborn, M., Jönsson, M., Wang, A., Phan, V., Lampinen, M., … Söderholm, J. D. (2011). Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, *140*(5), 1597–607. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.042

Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., … Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421*(6921), 384–388. doi:10.1038/nature01339

Wayner, E. A., Gil, S. G., Murphy, G. F., Wilke, M. S., & Carter, W. G. (1993). Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, *121*(5), 1141–52.

Weitzman, J. B., Pasqualini, R., Takada, Y., & Hemler, M. E. (1993). The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and homotypic cell aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(12), 8651–7.

Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., & Damsky, C. H. (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *The Journal of Cell Biology*, *109*(2), 877–89.

Xie, G., Cheng, K., Shant, J., & Raufman, J.-P. (2009). Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *296*(4), G755–63. doi:10.1152/ajpgi.90519.2008

Yang, W. L., & Frucht, H. (2000). Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, *21*(10), 1789–1793.

Zbar, A. P., Simopoulos, C., & Karayiannakis, A. J. (2004). Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. *Journal of Gastroenterology*, *39*(5), 413–21. doi:10.1007/s00535-004-1335-8

Conclusions et Perspectives

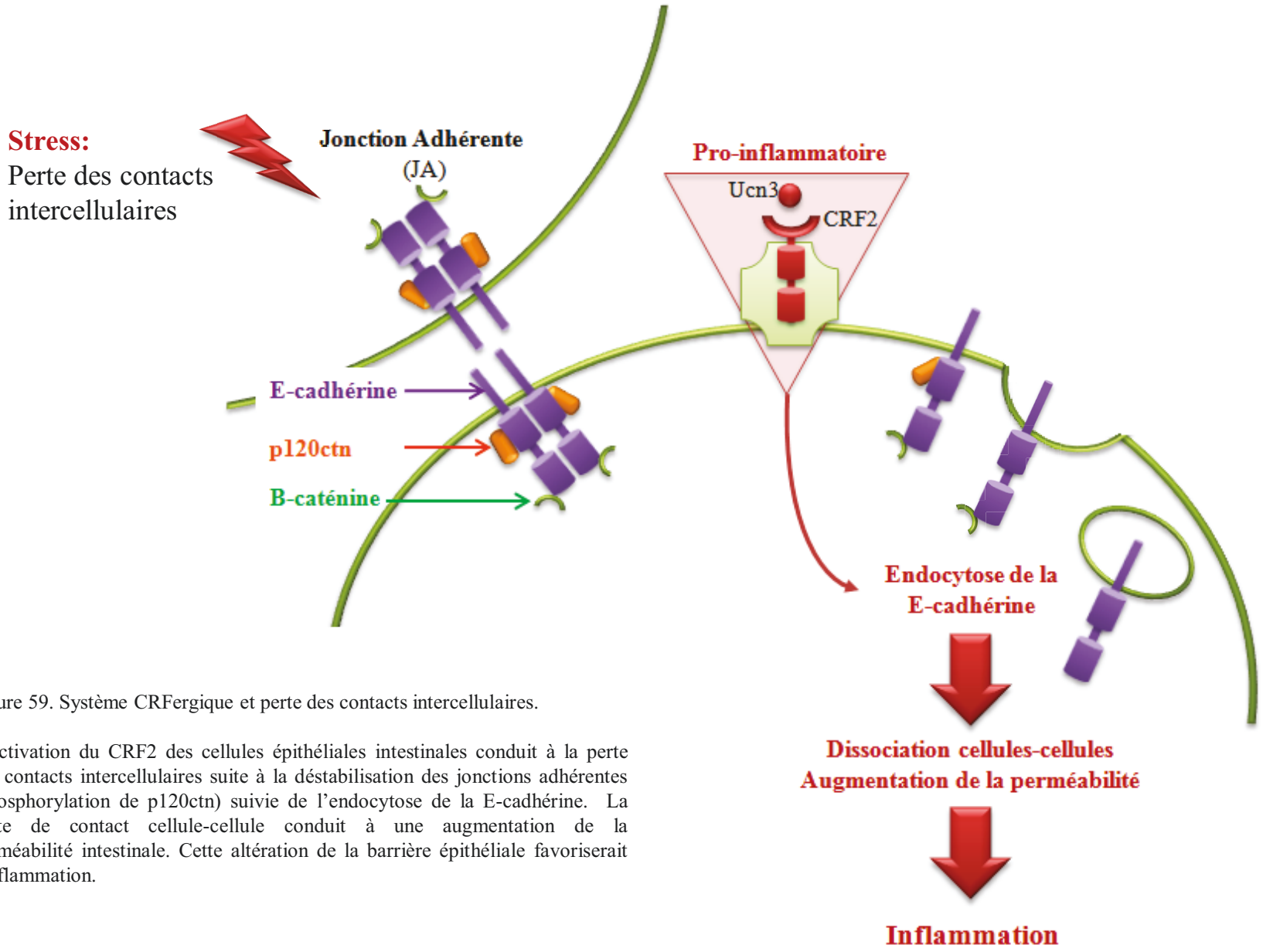


Figure 59. Système CRFergique et perte des contacts intercellulaires.

L'activation du CRF2 des cellules épithéliales intestinales conduit à la perte des contacts intercellulaires suite à la déstabilisation des jonctions adhérentes (phosphorylation de p120ctn) suivie de l'endocytose de la E-cadhérine. La perte de contact cellule-cellule conduit à une augmentation de la perméabilité intestinale. Cette altération de la barrière épithéliale favoriserait l'inflammation.

Conclusions et Perspectives

1) Le système CRFergique et l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Le stress peut être considéré comme l'un des maux du siècle. Il touche de nombreux individusindépendamment de leur âge et de leur milieu socio-culturel.Un nombre grandissant de recherches met en évidence que cet environnement anxiogène subit quotidiennement impact la prise alimentaire, la fatigue, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type II(Stengel & Taché, 2014).Le stress conduit également à une perturbation de l'homéostasie de la barrière épithéliale cutanée ou intestinale induisant respectivement une aggravation des maladies de peau comme l'eczéma ou le psoriasis (Arck, Slominski, Theoharides, Peters, & Paus, 2006) et des troubles gastro-intestinaux tels que les MICI et le syndrome de l'intestin irritable (Chang et al., 2011).

Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au stress et la prise en compte de ce paramètre dans l'étiologie des MICI pourraient permettre une meilleur prise en charge des patients MICI (développement d'agent pharmaceutique, changement du cadre de travail, de vie, hypnose...).

Le système CRFergique est un élément central des altérations induites par le stress. Ce système a initialement été décrit au niveau du SNC. Plus récemment, l'expression des récepteurs au CRF et de leurs ligands a été décrite au niveau du tube digestif (Buckinx et al., 2011), mais les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'ils impliquent sont mal connus et plutôt focalisés sur le SNE et ses interactions avec le système immunitaire digestif (Kiank et al., 2010).Les travaux réalisés au laboratoire appréhendent la compréhension du système CRFergique sous un angle original puisque nous étudions la fonction des récepteurs au CRF exprimés par les cellules épithéliales intestinales.

Nous avons montré que l'activation du CRF2 pourrit jouer un rôle dans la régulation de la barrière épithéliale intestinale en perturbant l'organisation et la fonction de l'épithélium. Dans des lignées de carcinomes colique capables de se différencier vers un phénotype entérocytaire, l'activation du CRF2 entraine une augmentation de la perméabilité para- et trans-cellulaire associée à une perte de l'organisation des jonctions adhérentes et des protéines qui les constituent au niveau de la membrane plasmique (figure 59). Ces phénomènes sont

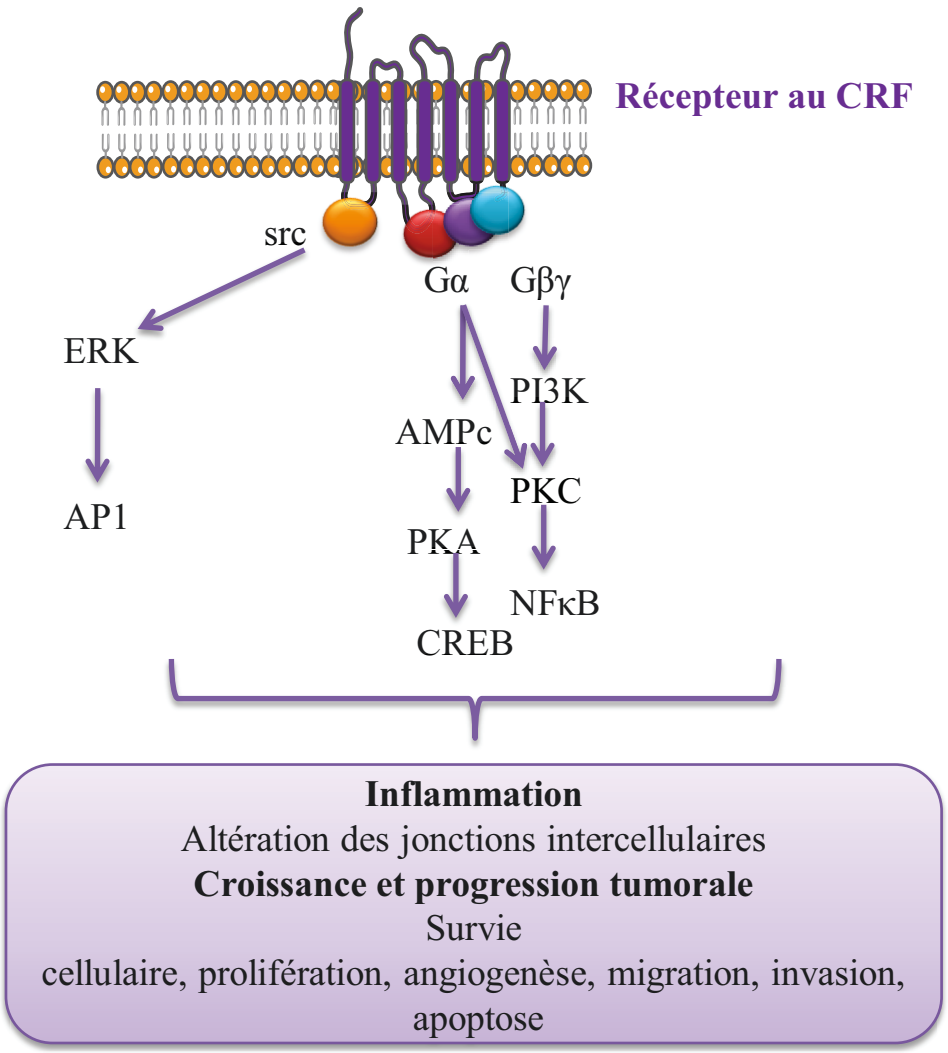


Figure 60. La signalisation du système CRFergique.

La signalisation des récepteurs CRF est couplée aux protéines G et à la kinase src. L'activation du système CRFergique conduit

i) à la perte des contacts intercellulaires favorisant l'altération de l'épithélium intestinal et ainsi l'inflammation

ii) à des mécanismes facilitant la croissance et la progression tumorale comme la survie cellulaire, l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaire.

transitoires. Cependant lors de l'activation répétée ou chronique de ce système, les altérations de l'épithélium sont maintenues et on observe un retard dans le processus de différenciation entérocytaire (voir une dédifférenciation cellulaire) illustrée par une diminution de l'expression et de l'activité des enzymes digestives comme PA et DPPIV. Par ce biais, le CRF2 pourrait avoir un rôle pro-inflammatoire.

Plusieurs voies de signalisation ont été décrite suite à l'activation des récepteurs CRF, telles que les protéines kinases A, B, C, p38 et les MAPK p42/44 (ERK1/2), mais aussi NOS, Fas, NFκb ou le flux calcique (Grammatopoulos & Chrousos, 2002) (figure 60). La voie de signalisation sollicitée dépend du sous-type de la protéine Gα associée au récepteur CRF. Ainsi, ces récepteurs sont principalement couplés à la sous-unité Gαs qui active l'adényl cyclase et produit de l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc) (Chen, Bilezikjian, Perrin, Rivier, & Vale, 1986). Lorsqu'ils sont associés aux sous-unités telles que Gαq, i, o ou z, ils activent des voies de signalisation telles que la phospholipase C (PLC) ou PI3K/AKT alors que l'association des récepteurs CRF avec Gβγ amène à l'augmentation du flux calcique (Gutknecht, Vauquelin, & Dautzenberg, 2010; Karteris, Grammatopoulos, Randeva, & Hillhouse, 2000).

Nous avons mis en évidence une voie de signalisation mettant en jeu la protéine kinase src. Cette kinase interagit avec les récepteurs au CRF lorsqu'ils sont endocytés et elle participe à l'activation de ERK (Ducarouge et al., 2013; Van Kolen et al., 2010). Ces voies de signalisation qui conduisent à l'altération des JA affectent également les adhérences cellules-MEC en remodelant les adhérences focales suite à l'activation de FAK. Cette étape associée à une production de MMP3 et MMP7 favorise la migration et l'invasion cellulaire. L'activation du CRF2 pourrait donc avoir un effet pro-tumoral. Cette hypothèse est corroborée par l'analyse de l'expression du système CRFergique dans différents tissus de CCR. Nous avons observé que l'expression du CRF2 et de ses ligands est augmentée dans ces tissus et les cellules adénomes carcinome colique. Ce niveau d'expression est fonction du grade tumoral et du stade de différenciation : le niveau d'expression étant plus fort dans les grades IV ou métastases et les cellules les moins différenciées.Le CRF2 pourrait induire la progression tumorale par l'activation de la voie Wnt, le contrôle de l'apoptose, la régulation de l'angiogenèse, et l'augmentation de la migration et l'invasion (pour revue Ducarouge et al, 2013).

L'ensemble de ces travaux participe à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la régulation de l'inflammation et de la progression tumorale par le stress. L'identification des voies de signalisation et des effecteurs impliqués dans le système CRFergique pourraient permettre de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prévention et/ou le traitement de diverses maladies comme les MICI et les CCR.

La suite de ce travail pourrait se décliner en plusieurs axes :

Etude approfondie de l'altération de la différenciation

Certaines de nos expériences ont été réalisées dans des cellules HT-29. Ce modèle d'étude permet un analyse limitée de l'effet de l'Ucn3 sur les contacts intercellulaires puisque seules les jonctions adhérentes sont mises en place. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence de l'activation du CRF dans un modèle cellulaire présentant des jonctions adhérentes et des jonctions serrées tel que les cellules Caco-2/TC7. Les cellules différenciées pendant minimum 21 jours pourront être incubées avec l'Ucn3 (100 nM, 2-5h) pour analyser les modifications:
i) d'expression des protéines des JS comme ZO-1, les claudines, JAM et la tricelluline par Western blot ;
ii) de leur localisation dans les RL aprèsséparation des membranes sur gradient de saccharose et par immunofluorescence ;
iii) de la perméabilité trans-cellulaire (Dextran-FITC) et para-cellulaire (TEER)
iv) des activités spécifiques de la PA et de la DPPIV en présence et en absence d'antagonistes spécifiques du CRF2 comme l'A2b.

Lors de notre étude du taux de transcrits de DPPIV par RT-PCR, la GAPDH est utilisée comme contrôle interne. Cependant le taux d'ARNm de GAPDH augmente lors de la différenciation des cellules Caco-2 faisant de la GAPDH une référence interne inadéquate. Les travaux de Beaulieu ont permis de caractériser et identifier deux gènes dont la transcription est stable au cours de la différenciation : RPL0 et B2M (Dydensborg, Herring, Tremblay, Beaulieu, & Bondo, 2006). Le suivi de marqueurs de différenciation (DPPIV, PA) en RT-PCR devrait être réalisé avec un contrôle interne plus stable comme RPL0.

Nous avons également observé que le traitement à l'Ucn3 (100 nM, 5 heures) n'induit pas d'altérations de la différenciation dans des cellules Caco-2 à 15 jours de culture. A contrario, l'activation du CRF2 provoque une diminution de l'expression protéique de KLF4, de la

transcription de l'ARNm DDPIV et de l'activité spécifique de la PA dans les cellules Caco-2 différenciées (J21). Ces modifications seraient-elles dues à une dédifférenciation ?
Pour tester cette hypothèse, les cellules seront différenciées pendant un minimum de 21 jours. Puis les cellules seront traitées de façon aigu ou chronique pendant plusieurs jours par l'UCn3 (100 nM). Dans ces diverses conditions, les études biochimiques seront complétées par une analyse de l'ultra-structure des cellules en microscopie électronique afin d'identifier les caractéristiques des entérocytes telles que la polarité cellulaire, la mise en place des jonctions intercellulaires et les microvillosités.

Enfin, nous avons étudié l'effet de l'Ucn3 sur des cellules différenciées ou en cours de différenciation, mais l'activation du CRF2 aurait-elle un effet sur les cellules souches ?
L'expression des récepteurs CRF pourrait être analysée sur les cellules souches $Lgr5^+$ isolées ou sur des coupes de tissus. L'influence de l'Ucn3 sur le devenir de ces cellules pourrait être étudiée grâce à des organoïdes. L'équipe de Hans Clevers a mis au point un protocole de culture de ces cellules souches permettant la croissance et le maintien à long terme d'organoïdes (Sato et al., 2011). Ces organoïdes possèdent une organisation crypto-villositaire avec une monocouche cellulaire contenant cellules souches et progénitrices, ainsi que l'ensemble des types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal.

Etude de la distribution du CFR1 et CRF2

La distribution des récepteurs au CRF « épithéliaux » le long de l'axe-cryto-villositaire ou des cryptes, et leur régulation selon les pathologies, pourrait être affinée car il existe plusieurs travaux contradictoires. Ainsi i*n vivo*, CRF1 serait principalement localisé à la base des cryptes alors que CRF2 se situerait dans les 2/3 supérieur des cryptes(Chatzaki et al., 2004). *In vitro,* sur les cellules épithéliales de cryptes versus villus, nous avons observés plus de CRF2 au niveau des cryptes que des villus.

Une répartition différentielle des récepteurs CRF est également observée dans certaines tumeurs de la glande mammaire où le CRF1 est exprimé au cœur des tumeurs et le CRF2 est exprimé en marge de la tumeur (Kaprara, Pazaitou-Panayiotou, Kortsaris, & Chatzaki, 2010). La ségrégation du CRF1 et CRF2 pourrait être élucidé dans les tumeurs colorectales, on peut penser que le CRF1 pourrait être exprimé au niveau des cellules souches présente au milieu

des tumeurs alors que le CRF2 de par son rôle dans l'invasion serait préférentiellement exprimé à la périphérie de la tumeur.

Par ailleurs, l'inflammation chronique du tube digestif chez les patients MICI favorise l'apparition de dysplasie à l'origine de CCR. Il serait intéressant d'étudier la distribution du système CRFergique :

i) chez des patients atteint de MICI (dans les tissus sains et les tissus inflammés) ;

ii) dans un modèle animal AOM/DSS ou $APC^{-/-}$ /DSS minant la susceptibilité à développer des tumeurs des patients MICI en association avec un stress psychologique (séparation maternelle) et/ ou l'injection d'agoniste et d'antagoniste CRFergique.

L'altération de la distribution du CRF1/CRF2 pourrait être utilisée comme un marqueur de la pathologie voir comme pronostic de développer un CAC.

Etude de l'interaction cellule-MEC lors de la migration

L'expression et l'activation des intégrines et la régulation de la MEC interviennent dans les processus de migration et d'invasion. Nous avons montré que l'Ucn3 par l'activation du CRF2 induit la migration des cellules HT-29. L'activation de src et la phosphorylation de FAK par l'Ucn3 sont en faveur d'un changement d'activation des intégrines. Nous pourrions donc analyser les changements d'expression et/ou d'activation des intégrines en présence d'UCn3, en particulier d'αV impliquées dans la TEM.

Par ailleurs, la production de la laminine-332 (LN332) est augmentée dans les cancers colorectaux. Sa dégradation par la MMP3 favorise la migration et l'invasion cellulaire (Zucker & Vacirca, 2004). L'activation du CRF2 induit à la fois une augmentation de LN332 et de MMP3 propice à la migration cellulaire. Il serait intéressant de suivre l'évolution de la LN332 chez les patients atteints de MICI ou dans des modèles murins DSS ou TNBS.

Etude des voies induites par la translocation nucléaires des caténines

La β-caténine régule l'adhérence cellule-cellule lorsqu'elle est associée aux cadhérines mais intervient également dans la transcription de gène en étant un acteur de la voie de signalisation Wnt après translocation nucléaire (Behrens et al., 1996). Sous l'effet de l'Ucn3, les cellules se dissocient induisant la séparation du couple E-cadhérine/β-caténine. Lorsque la β-caténine n'est pas associée avec la E-cadhérine, elle est peut-être :

-prise en charge par le complexe multiprotéique APC/ axine/ GSK3 dans le cytoplasme et elle est ensuite dégradée par le protéasome (Aberle, Bauer, Stappert, Kispert, & Kemler, 1997).

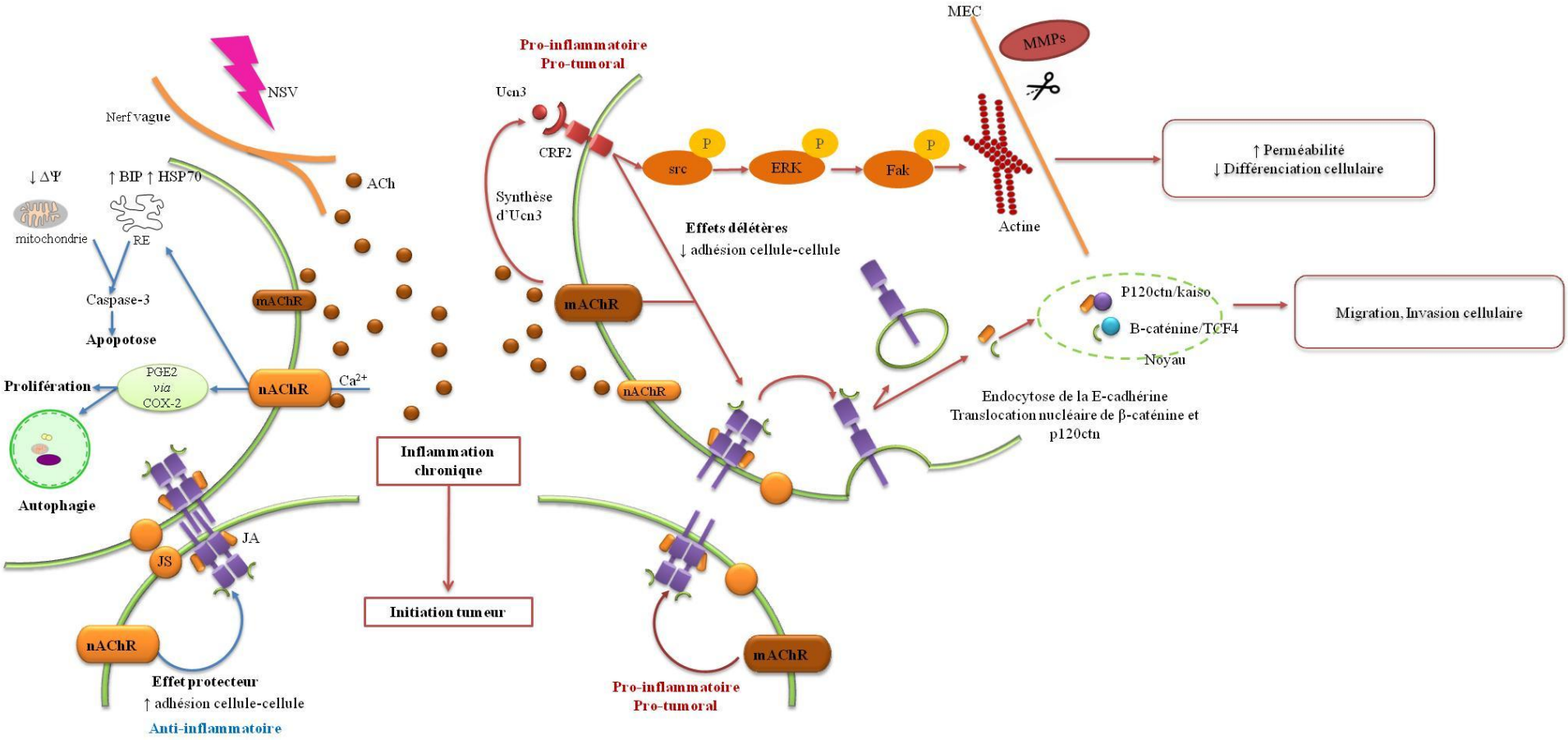


Figure 61 : Ying et Yang.

L'activation des nAChRs induite par la nicotine permet le maintien de l'organisation des cellules épithéliales. Cet effet protecteur est permis par la stimulation d'α7 nAChR, seul récepteur nicotinique fonctionnel des cellules HT-29. La nicotine déclenche un afflux de Ca^{2+} après avoir activée α7 nAChR, induite par les ROS mitochondriaux associé à une augmentation du stress cellulaire (RE et mitochondrie). Cela se traduit par l'activation de la caspase 3 ce qui induit l'apoptose. En outre, la nicotine induit une augmentation de l'expression de la COX-2 (dépendant de PI3K) et de la production de prostaglandine E2.

Ces processus induiraient la stimulation de l'autophagie, éliminant les organites endommagés, ainsi que la prolifération cellulaire expliquant le rôle protecteur des nAChRs.

L'ACh provoque des modifications des propriétés d'adhérence cellulaire corrélé à l'acquisition d'un potentiel invasif . Les mAChRs pourraient prendre part à la signalisation du CRF2 provoquant une diminution de l'adhérence cellulaire et une augmentation de l'invasion. L'interaction entre les récepteurs muscariniques et CRFergiques seraient permis par l'activation de src/ERK/Fak, les Rho GTPases et la laminine-332. Les mAChRs pourraient être des composants pro-inflammatoires et pro-tumorale.

- transportée dans le noyau où elle s'associe au facteur de transcription TCF4 et active des gènes pro-prolifératifs comme Myc et cycline D1 (He et al., 1998; Tetsu & McCormick, 1999) ainsi que MT1-MMP (*Membrane Type 1 Metalloprotease*) et LAMC2 (*Laminin-5γ-2*) associés à l'invasion (Bienz, 2005; Sánchez-Tilló et al., 2011).

Dans les cellules HT-29, nous avons observé sous l'effet de l'Ucn3, une translocation des caténines au niveau du noyau. L'interaction entre le système CRFergique et la voie Wnt a déjà été mise en évidence dans le cancer du sein (Arranz et al., 2010). Notre travail pourrait donc être poursuivi par l'étude de la signalisation par la β-caténine lors d'un stress chronique en suivant l'activation de la voie TCF/LEF à l'aide d'une construction luciférase (TOP FLASH vector).

Nos expériences ont également mis en évidence que l'Ucn3 induit à la fois une augmentation du ratio p120cnt/kaiso au niveau du noyau et une augmentation de la transcription de la MMP3 et MMP7. Dans les cellules HT-29, l'isoforme 3 de la p120ctn interagit avec le facteur kaiso (J M Daniel & Reynolds, 1999) et la formation du complexe p120ctn/kaison provoque non seulement l'expression de MMP7 mais également celles de Wnt11 ou MTA2 (*metastasis-associatedgene 2*) en levant la répression exercée par kaiso (Juliet M Daniel, Spring, Crawford, Reynolds, & Baig, 2002; Kim et al., 2004; Prokhortchouk et al., 2001). Notre étude pourrait être compléter par un criblage permettant d'appréhender les gènes réguler par le couple p120ctn/kaiso et β-caténine/TCF4 en réponse à l'activation du CRF2 par l'Ucn3.

Etude des protéines Gα12 et Gα13 dans la régulation des jonctions serrées et adhérentes

Les protéines Gα12 et Gα13 régulent les JA et JS en jouant un rôle dans l'assemblage et le maintien des contacts intercellulaires. Dans les cellules MDCKII, l'expression de mutants Gα12 induit une dissociation des JA et des JS provoquant une augmentation de la perméabilité paracellulaire par une voie dépendante de src (Meyer, Schwesinger, & Denker, 2002). Les mutants Gα13 provoque également la dissociation des JA et des JS associée à la formation de fibre de stress. Ces effets sur le cytosquelette d'actine et sur la redistribution des protéines des JS sont abrogés par un inhibiteur de la kinase Rho, Y27632, mais pas par PP2, un inhibiteur de src. Gα13 induit une augmentation du transport para-cellulaire par une voie dépendant de Rho (Donato et al., 2009). Ces protéines s'associent aux caténines et sont localisées au niveau de la membrane plasmique.

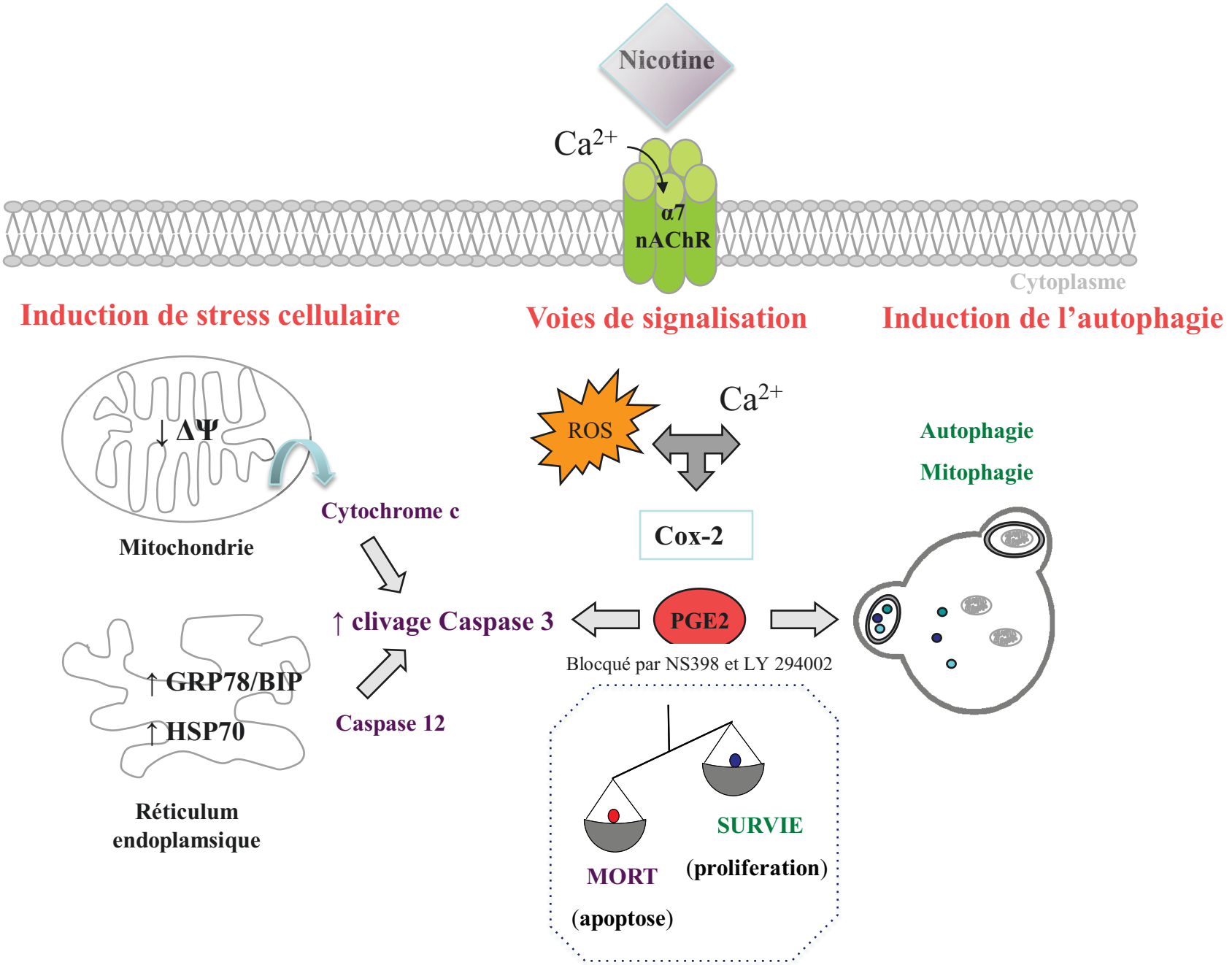


Figure 62: Les voies activées par les nAChRs

Nous avons observé que l'Ucn3 induit l'altération des jonctions intercellulaires par une voie dépendante de src. p120ctn est alors dissociée de la E-cadhérine et est transportée dans le noyau. Par ailleurs, p120ctn est un modulateur important de l'activité des Rho GTPases. Des résultats du laboratoire mettent en évidence une augmentation de RhoA qui coïnciderait avec la translocation de p120ctn dans le noyau. L'Ucn3 pourrait induire la dissociation des JA et des JS en agissant soit directement sur la voie src et Rho, soit indirectement par l'altération de l'expression et une délocalisation des Gα. Il serait donc intéressant d'analyser dans un modèle cellulaire différencié (Caco-2) les modifications d'expression (WB) et de localisation (IF) des protéines Gα12 et Gα13. Mais aussi l'état de phosphorylation des caténines en particulier de p120ctn initialement décrite comme un substrat de la protéine src.

2) Le système cholinergique et l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Les traitements des MICI induisent des effets secondaires (hématologiques, infectieux, lymphomes, auto-immunisation…) et posent des problèmes d'observance.

Récemment, un rôle anti-inflammatoire des efférences vagales périphériques, par un effet anti-TNF impliquant le récepteur α7nAchR des macrophages, a été mis en évidence. La neurostimulation vagale a montré son intérêt dans le traitement de l'épilepsie, de la dépression mais peu de recherches fondamentales ou cliniques se sont intéressées à son effet dans le domaine de la pathologie inflammatoire digestive.

Le laboratoire a mis au point un modèle de NSV chronique des efférences vagales à basse fréquence (5 Hz) chez le rat vigile et observé un effet anti-inflammatoire dans un modèle de colite expérimentale (Meregnani et al., 2011) où l'effet anti-inflammatoire est permis par les macrophages.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est concentré les aspects moléculaires du rôle de la voie cholinergique dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Nous avons mis en évidence un rôle opposé des nAChRs et des mAChRs où l'activation des mAChRs induite par l'ACh entraîne la dissociation des cellules associée à des changements dans l'expression et la localisation des protéines des JA et des JS (figure 61). L'ACh provoque des modifications des propriétés d'adhérence cellulaire corrélée à l'acquisition d'un potentiel invasif. A contrario,

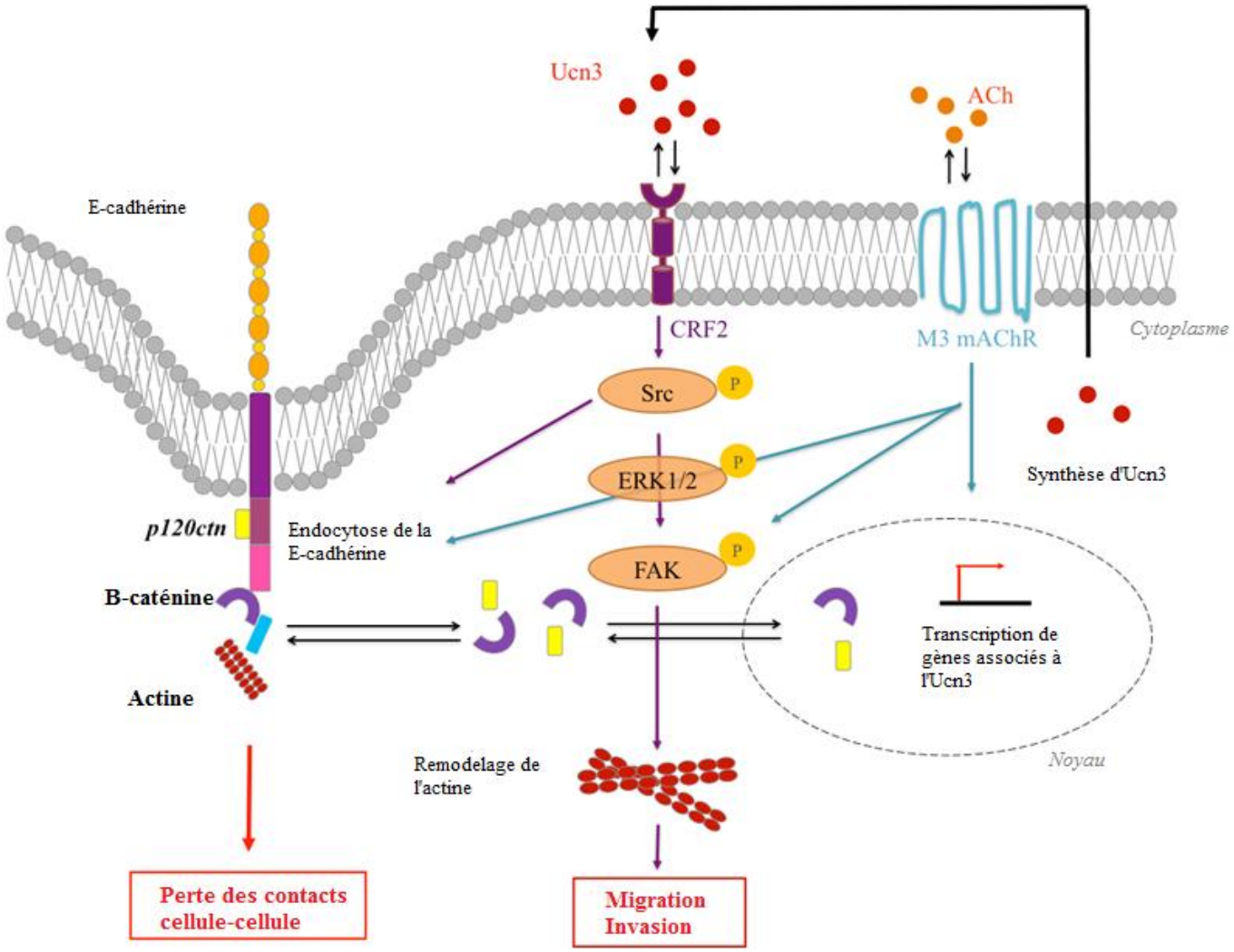


Figure 63 : Rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral du CRF2 et des mAChRs

l'activation des nAChRs induite parla nicotine permet le maintien de l'organisation des cellules épithéliales sous l'effet d'un stress Ucn3. Cet effet protecteur est permis par la stimulation d'α7 nAChR, seul récepteur nicotinique fonctionnel des cellules HT-29.

L'activation des nAChRs permettrait la protection de la barrière épithéliale alors que l'activation des mAChRs (plus spécifiquement M3 mAChR) pourrait aggraver la maladie en maintenant l'inflammation. Ces données ont des répercussions importantes sur le potentiel thérapeutique de la VNS dans les MICI, où les récepteurs nicotiniques et muscarniques représentent "le yin et le yang" de l'homéostasie intestinale.

Dans des cellules HT-29, nous avons montré que la nicotine *via* le α7nAChR, induit la production de ROS mitochondriaux et une altération du potentiel de membrane mitochondrial associés à l'induction de stress cellulaires (RE et mitochondrie). Cela se traduit par l'activation des caspases-3 et -12 qui induisent l'apoptose. En outre, la nicotine induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la COX-2 (dépendant de PI3K) et donc la production de prostaglandineE2. Ces processus induiraient la stimulation de l'autophagie, éliminant les organites endommagés, ainsi que la prolifération cellulaire expliquant le rôle protecteur des nAChRs (figure 62).

L'existence d'une interaction entre les systèmes CRFergique et cholinergique date d'expériences pionnières montrant sur des rats Wistar-Kyoto qui présentent une faible activité acétylcholinestérase mais une grande sensibilité au stress suggérant un rôle de l'ACh chez ces rats avant l'exposition au stress (P. R. Saunders, Hanssen et Perdue, 1997). Plus récemment il a été proposé que le dysfonctionnement de barrière provoqué par le stress psychologique dépend de la libération d'ACh par des nerfs entériques après activation des CRF (Demaude et al, 2009; Gareau, Jury et Perdue, 2007). Ces données indiquent que le système CRF peut contrôler les niveaux d'ACh.

Dans des cellules HT-29, nous avons également mis en évidence une interaction entre le système CRFergique périphérique et la voie de signalisation induite par ACh et les mAChRs au niveau des cellules épithéliales. Mais dans ce cadre, c'est l'ACh qui contrôle le niveau local de ligand pour ce récepteur. En effet la stimulation des mAChRs par l'ACh entraine la synthèse et la libération d'Ucn3 qui va pouvoir activer CRF2. Ainsi l'ACh pourrait potentialiser les effets du stress, ceci à faible concentration (nM) et donc contribuer à la fois aux effets pro-inflammatoire et pro-tumoral du CRF2 (figure 63). A plus forte concentration,

l'ACh stimule la prolifération et la migration cellulaire via une interaction entre les mAChR et les récepteurs à l'EGF (Von Rosenvinge & Raufman, 2011). En effet, il a été montré que la liaison de l'ACh au M3 mAchR active MMP7 qui libère le ligand HBEGF pour agir sur son récepteur (Xie, Cheng, Shant, & Raufman, 2009). Cette signalisation conduit à l'activation :
- de la voie PI3K/AKT et la survie cellulaire ;
- de la voie MEK et la migration cellulaire (Belo et al., 2011).

Ainsi selon sa concentration l'ACh pourrait « transactiver » différents récepteurs exprimés sur les cellules épithéliales et contribuer au développement tumoral. D'autre part, *via* les M3 mAChR, l'ACh augmente la perméabilité trans- et para-cellulaire (Cameron & Perdue, 2007). Comme le CRF2, les mAChRs pourraient être des composants pro-inflammatoire et pro-tumorale.

La suite de ce travail pourrait se diviser en plusieurs axes :

Etude de la spécificité des récepteurs cholinergiques

Pour confirmer nos travaux et spécifier la nature des récepteurs cholinergiques sollicités, les expériences doivent être répétées à l'aide d'agonistes et d'antagonistes spécifiques. Dans un modèle cellulaire telle que HT-29 qui exprime M1 et M3 mAChR et α7 nAChR, on peut réitérer nos expériences en substituant l'ACh par de:

- L'atropine, agoniste des mAChRs ;
- Le 4-DAMP, antagoniste spécifique de M3 mAChR ;
- La pilocarpine, agoniste spécifique de M3 mAChR ;
- Le carbachol, agoniste ayant une affinité supérieure à M1 mAChR ;
- L'AR-R1779, agoniste spécifique d'α7 nAChR
- Le methyllycaconitine, antagoniste spécifique d'α7 nAChR.

De même concernant l'étude sur les mAChR, il a été montré que l'ACh pouvait « transactiver » l'EGFR et que cette étape était responsable des effets de l'ACh sur la migration cellulaire. Dans notre étude, et à la concentration utilisée d'ACh, nous n'avons pas vu d'activation du récepteur mesurée par son état de phosphorylation en Western blot. Cependant, nous pourrions reproduire nos expériences en présence de tyrphostin AG1478, un inhibiteur du récepteur à l'EGF.

Distribution des récepteurs cholinergiques

La NSV pourrait être avoir un potentiel thérapeutique si elle permet l'activation des nAChRs. L'analyse de la distribution des récepteurs cholinergiques le long du tube digestif n'a encore jamais été réalisée. Il serait intéressant d'analyser sur des biopsies le niveau d'expression des AChRs en fonction, d'une part du type de pathologie (RCH *versus* MC) et d'autre part de la phase de la maladie (poussée *versus* rémission). Cette étape me semble essentielle pour pouvoir proposer la VNS comme un traitement efficace : les patients présentant une expression plus importante de mAChRs que de nAChRs ne devront pas se voir proposer cet outil thérapeutique.

Annexes

Système intestinal

27

B. DUCAROUGE, M. PELISSIER-ROTA, M. ROLLI-DERKINDEREN, B. LARDEUX, M. LAINÉ, M. NEUNLIST, M. JACQUIER-SARLIN

Généralités sur le système digestif

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules qui borde la lumière du tube digestif. La fonction principale de cet épithélium est l'absorption des nutriments au cours de la digestion. Cette muqueuse sert également de barrière vis-à-vis de nombreuses stimulations antigéniques d'origine alimentaire, bactérienne, virale et parasitaire. Cet organe est donc la cible d'agressions permanentes dont l'accumulation peut conduire à une réponse inflammatoire chronique favorisant une dérégulation de la morphologie et des fonctions de l'intestin responsables de diverses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou les cancers colorectaux. L'homéostasie et la fonctionnalité de cet épithélium dépendent de plusieurs populations cellulaires réparties dans les différentes couches constituant le tube digestif. En effet, le tube digestif est un organe où convergent plusieurs systèmes qui interagissent les uns avec les autres. Ainsi, le système nerveux entérique, via la libération de divers neuromédiateurs et hormones, va contrôler la motricité et les fonctions sécrétrices de l'épithélium. Il va également participer au maintien de la barrière intestinale, soit en favorisant le renouvellement ou la restitution de l'épithélium, soit en modulant l'activité des cellules immunitaires de la lamina propria (Lundgren et al., 2011 ; Matteoli, 2011 ; Van Landeghem et al., 2011 ; Dhawan et al., 2012). Ces mêmes cellules immunitaires régulent également la barrière épithéliale par le biais de cytokines.

La formation du tube digestif dérive de l'association d'endoderme embryonnaire et de mésoderme splanchnique : dans les phases précoces du développement, l'intestin embryonnaire est composé d'une couche interne d'endoderme multistratifié entourée par une couche de mésenchyme. Le développement de l'intestin se déroule selon trois axes : un axe temporel, un axe cranio-caudal (de la bouche vers l'anus), et un axe crypto-villositaire (de la séreuse vers la lumière intestinale). Les divisions cellulaires au cours du développement embryonnaire vont donner lieu selon une chronologie précise à plusieurs phénotypes caractéristiques des cellules épithéliales. Les cellules intestinales différenciées sont classées en deux groupes : absorbantes ou sécrétrices selon leur fonction ou leur programme génétique de différenciation. Les entérocytes ou côlonocytes (au niveau du côlon) constituent le type de cellules absorbantes. Les cellules sécrétrices sont de cinq types : les cellules **de** gobelet (cellules à mucus ou calciformes), les cellules de Paneth, les cellules entéroendocrines, les cellules Tuff et les cellules M au niveau des plaques de Peyer dans l'intestin grêle (**figure 27-1**). Les caractéristiques de ces différents types cellulaires et leurs fonctions sont résumées dans le **tableau 27-I**.

Chez les vertébrés, le tube digestif est composé de deux segments anatomiquement et fonctionnellement distincts : l'intestin grêle et le côlon. Sur toute sa longueur, la paroi intestinale est constituée de quatre couches concentriques entourant la lumière intestinale : la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse. Cependant, l'organisation tissulaire de l'intestin grêle et du côlon est adaptée à leur fonction respective (*voir* figure 27-1A). Pour optimiser sa surface d'échange nécessaire à l'absorption, l'épithélium de l'intestin grêle forme des expansions semblables à des doigts qui se projettent dans la lumière appelées villosités. Entre ces villosités, l'épithélium forme des invaginations qui composent les cryptes de Lieberkühn. Au niveau du côlon, la surface de la muqueuse est plane, avec des cryptes plus profondes qui s'invaginent dans la lamina propria sous-jacente. L'unité fonctionnelle que représente l'axe crypte-villus est également caractérisée par une compartimentalisation cellulaire. En effet, les villosités sont délimitées par des cellules différenciées qui assurent les fonctions digestives (les entérocytes) ou un rôle protecteur vis-à-vis des agents pathogènes (les cellules de gobelet). Au contraire, les cryptes contiennent des cellules souches, des cellules progénitrices proliférant ou faiblement différenciées et un type de cellules différenciées, les cellules de Paneth intercalées entre les cellules souches.

L'épithélium digestif est un tissu très dynamique et en constant renouvellement puisqu'il est entièrement régénéré entre 3 à 5 jours (*voir* figure 27-1). Ce processus est assuré par les cellules souches situées au fond des cryptes qui s'auto-renouvellent et donnent naissance à des progéniteurs (cellules amplifiées transitoirement) qui occupent

Culture des cellules animales.indd 1 09/06/14 14:55

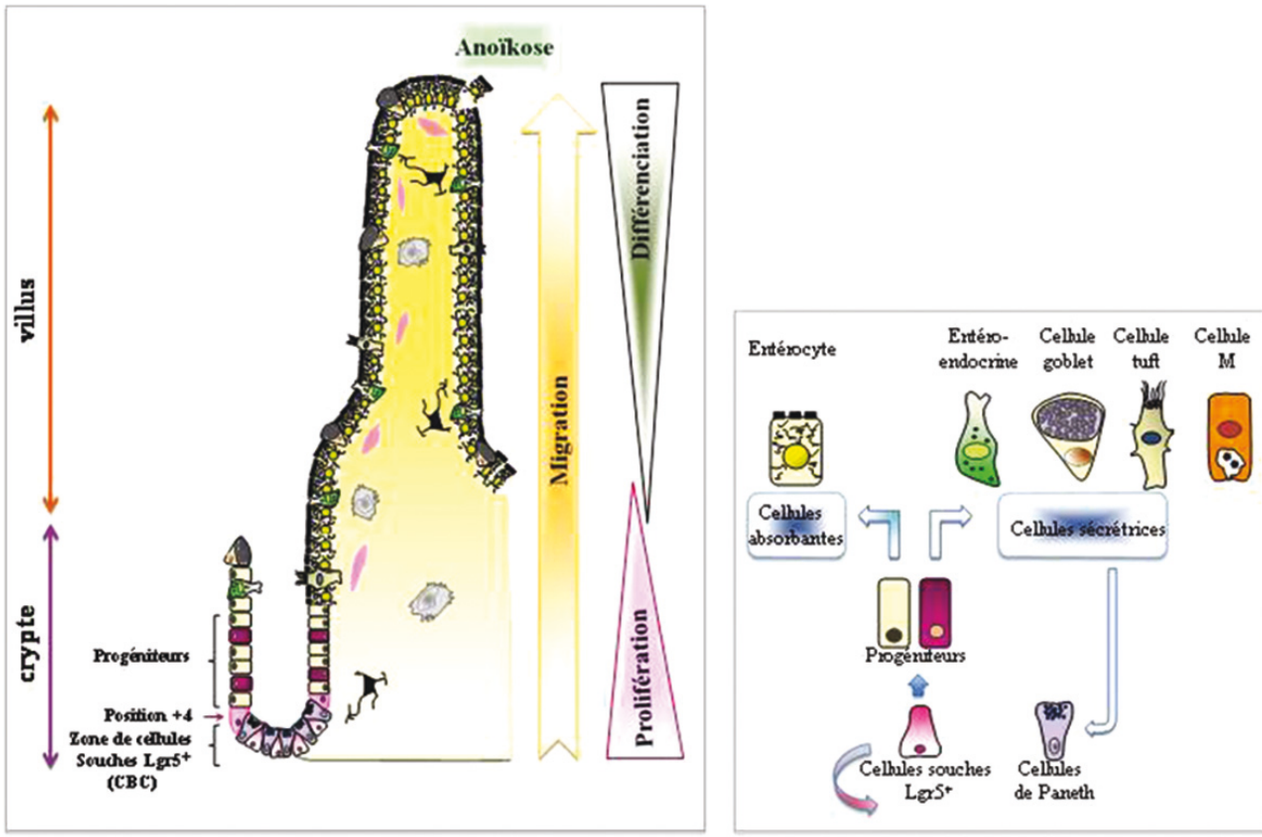


Figure 27-1 **Organisation de l'axe crypte-villus et renouvellement de l'épithélium intestinal.** **(A)** L'épithélium intestinal est constitué de deux structures différentes d'un point de vue anatomique et fonctionnel : les cryptes (contiennent les cellules souches, les progéniteurs et les cellules de Paneth) et les villus (contiennent la majorité des cellules différenciées). **(B)** L'épithélium intestinal est en constant renouvellement. Il contient des cellules souches situées dans la partie basse des cryptes (CBC et +4LRC). En se divisant, elles donnent naissance à des cellules progénitrices qui prolifèrent puis se différencient vers des lignages sécréteurs ou absorbants au fur et à mesure de leur migration vers les villus avant de se détacher et mourir par anoïkose. Les cellules de Paneth se différencient en migrant vers la base de la crypte.

la plus grande partie de la crypte. Ceux-ci subissent une dernière division avant de démarrer un programme de maturation et de différenciation terminale. La différenciation s'effectue au fur et à mesure que les cellules migrent en cohorte le long de l'axe crypte-villus avant de mourir par anoïkose et d'être exfoliées à l'extrémité des villosités dans l'intestin grêle. À l'inverse, les cellules de Paneth se différencient en migrant vers la base des cryptes.

Les mécanismes qui régulent la prolifération cellulaire au niveau des cryptes, la migration et la différenciation des cellules progénitrices sont partiellement compris. Il est admis que ces mécanismes reposent sur une régulation fine et spatio-temporelle de nombreux gènes le long de l'axe crypte-villus. Cette régulation implique des facteurs de transcriptions (Cdx2, Hox, HNF, GATA4…) exprimés sous le contrôle de facteurs de croissances, d'hormones, de cytokines, mais également par les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire (MEC) (Olsen et al., 2000 ; Teller et Beaulieu, 2001 ; Sancho et al., 2004). De même, des interactions réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme sont nécessaires pour les processus morphogénétiques et de différenciation qui ont lieu durant l'organogénèse et la migration le long de l'axe crypte-villus (Kedinger et al., 1998b ; Simon-Assmann et Kedinger, 1993 ; Yasugi et Mizuno, 2008).

Pour le fondamentaliste, le système digestif représente un système attractif pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement, la différenciation et la cancérisation des épithéliums. Du fait de la rareté des modèles de cellules intestinales « normales » humaines, c'est-à-dire non transformées, les connaissances acquises reposent principalement sur l'utilisation de cultures cellulaires obtenues à partir d'animaux ou de cancer colorectaux humains. Cependant, les récents progrès sur l'obtention et le maintien en culture de cellules « normales » conservant les caractéristiques de cellules souches, de cellules prolifératives des cryptes ou de cellules différenciées offrent de nouveaux outils pour

Culture des cellules animales.indd 2 09/06/14 14:55

Tableau 27-I Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal

Type cellulaire	Distribution	Lignage	Fonctions	Différenciation
Cellule souche 	< 1 % Crypte	Non différencié	Renouvellement du tissu épithélial	Marqueurs exprimés : Ascl2, sox9, bmi, musashi1, Lgr5, Olfm4
Entérocyte 	80-90 % Haut des cryptes/ villus	Absorbant	– Absorption des nutriments et export au pôle basal – Barrière, contrôle de la perméabilité de l'épithélium	– Cellules polarisées avec bordures en brosse – Facteurs de transcription importants : a et b HNF1, HNF6, Ptk6 – Marqueurs : Cdx2, SI, DP-PIV, alcaline phosphatase, Fabp2, villine…
Cellule à mucus (gobelet) 	Gradient proximo-distal : – intestin grêle : 5-15 % – côlon : 15-50 %	Sécréteur	– Sécrétion de mucus = revêtement protexcteur de l'épithélium – Sécrétion des peptides « Trefoil » favorisant le transit du bol alimentaire	– Signalisation Notch, HEx5, Klf4 – Marqueurs : cdx2, muc2…
Cellule de Panet apparaît après la naissance 	≈ 4 % Absente dans le côlon gauche Cryptes	Sécréteur	– Réponse antimicrobienne (sécrétion de lysozyme et de défensines) – Niche pour les cellules souches (produit des ligands de la voie Wnt, Notch et EGF récepteur)	– Différenciation en migrant vers la base des cryptes (guidée par un gradient EphB2) – Expression de la β-caténine nucléaire et sox9 pour leur différenciation – Longévité : 36 semaines – Marqueurs : Lyz1, Wnt3, Mmp7
Cellule entéro-endocrine 16 sous-types 	0,4-1 % Haut des cryptes/ villus	Sécréteur	Modulation endocrine : production et sécrétion d'hormones = rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale	– Nécessité de Neurogenin 3 (Ngn3) pour la différenciation – Voie Athoh1/Notch : HES1-Math1 – Marqueurs : Pdx-1, Nkx2, Pax4-6
Cellule Tuff 	≈ 4 % Haut des cryptes/ villus	Sécréteur	– « Senseur » du contenu luminal (α-gustducin, Trpm5) Sécréteur d'opioïdes – Modulation endocrine	Marqueurs : Sox9, Cox, Dclk1, Hpgds, ngn3…
Cellule M 	Dans les follicules lympoïdes/au niveau des plaques de Peyer	Sécréteur ?	Cellules présentatrices de microbes aux lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques	Transdifférenciation d'entérocytes matures (facteur RANK) ?

Culture des cellules animales.indd 3 09/06/14 14:55

étudier la fonction des cellules intestinales. L'utilisation de ces différentes populations cellulaires permet de reproduire en culture l'ensemble des cellules trouvées sur l'axe crypte-villus (**figure 27-2**). Dans ce chapitre, nous ferons une description détaillée, mais non exhaustive, des différents modèles cellulaires utilisés pour étudier la régulation de processus de régénération de l'épithélium digestif et sa fonction. La méthodologie utilisée pour générer ces modèles cellulaires ainsi que leurs caractéristiques sera également décrite. Puis, nous détaillerons l'influence des autres populations cellulaires de l'intestin sur la différenciation et la fonction de l'épithélium digestif. Nous axerons cette partie sur le rôle de la matrice extracellulaire (MEC) et l'implication du système nerveux entérique (SNE) dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

Principales populations cellulaires de l'épithélium digestif

Il s'agit de modèles cellulaires servant à étudier le renouvellement et les fonctions de l'intestin.

Cellules souches et organoïdes

Le maintien de l'homéostasie intestinale est assuré par un renouvellement constant et rapide des cellules épithéliales. Pour compenser cette grande perte de cellules spécialisées, de nouvelles cellules sont générées à partir d'une population de cellules souches multipotentes qui résident à la base des cryptes, selon l'*Unitarian hypothesis* de Leblond (Cheng et Leblond, 1974). Il a d'abord été proposé sur des expériences de marquage de l'ADN que les cellules en position (+4), directement après les cellules de Paneth, représentaient la population de cellules souches des cryptes (Potten et al., 1974 ; Potten et al., 1978 ; Che et al., 2008). La méthode de traçage de lignage est devenue la méthode de référence pour étudier le renouvellement et le potentiel de différenciation des cellules souches dans un tissu sain. Dans cette technique, un lignage cellulaire particulier est marqué, puis le devenir de ces cellules et de leurs progéniteurs est suivi au cours du temps (**figure 27-3A**). Ces expériences sont réalisées dans des souris co-exprimant deux transgènes différents : une recombinase CRE exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un lignage et un gène rapporteur (GFP, RFP, b-galactosidase)

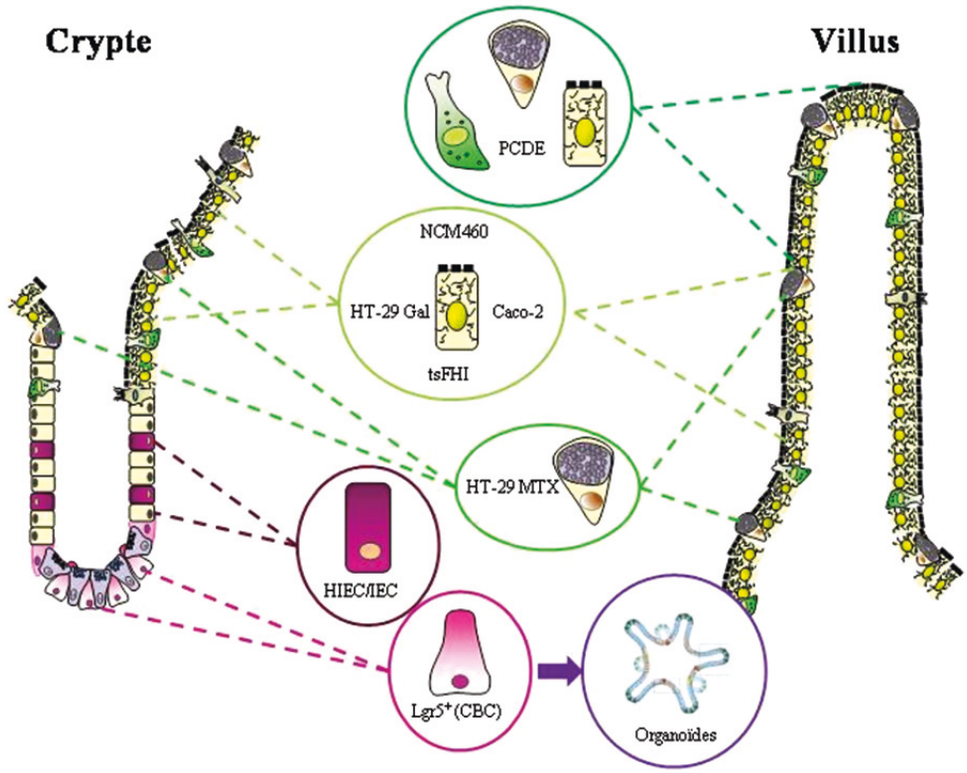


Figure 27-2 Modèles d'étude des cellules épithéliales en culture. Grâce à la diversité des modèles cellulaires disponibles, qu'ils soient issus de cultures primaires ou de lignées cellulaires, l'ensemble de l'épithélium intestinal est représenté (intestin grêle et côlon). Ces modèles permettent d'étudier le renouvellement de l'épithélium à partir des cellules souches ($Lgr5^+$ et organoïdes), les processus de prolifération et de différenciation des progéniteurs (IEC, HIEC) ou des cellules épithéliales (PCDE, HT-29, Caco-2, tsFHI, NCM460, HT-29 MTX).

Culture des cellules animales.indd 4 09/06/14 14:55

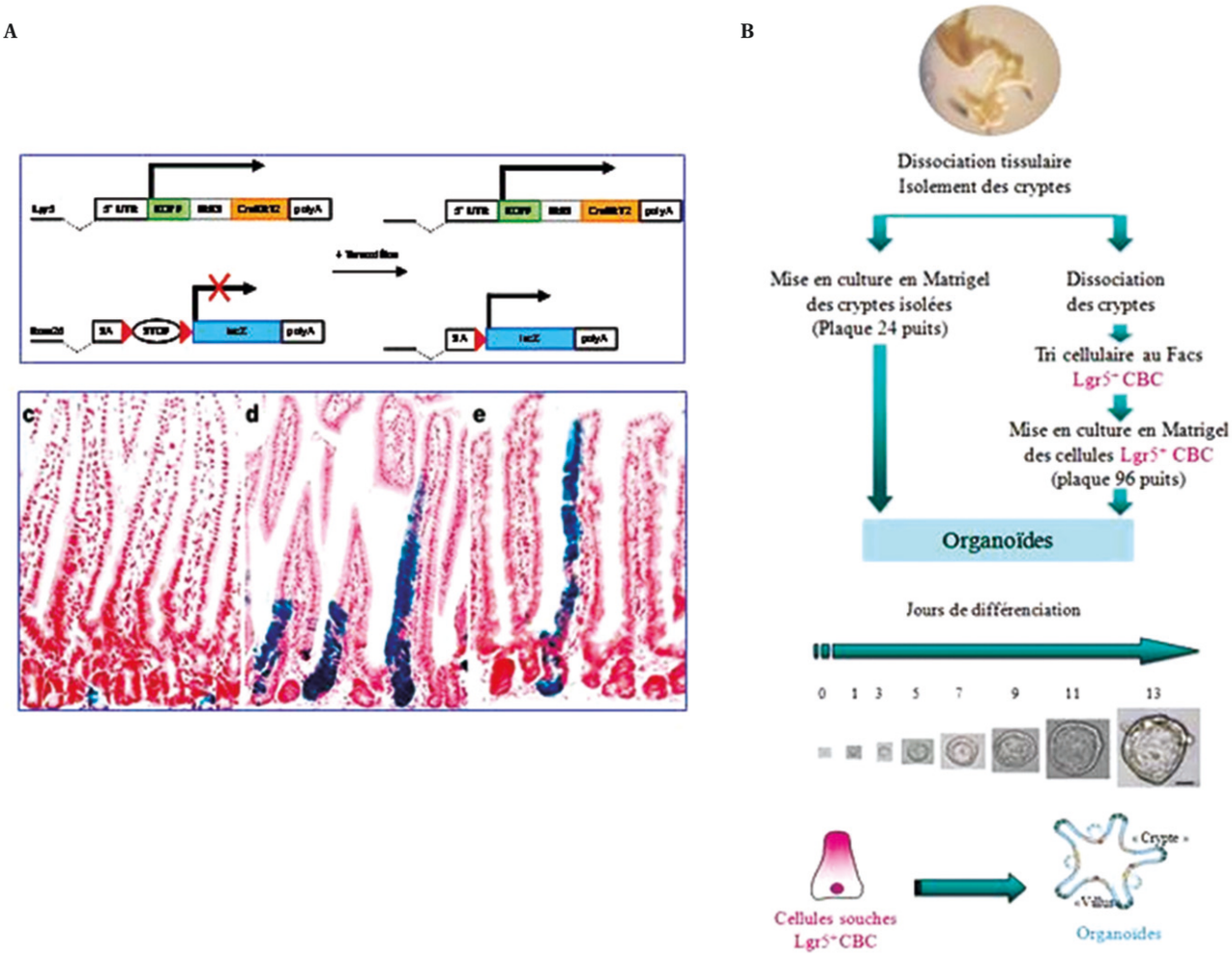


Figure 27-3 **Formation d'organoïdes intestinaux *in vitro* à partir de cryptes isolées ou de cellules Lgr5⁺. (A)** Méthode de traçage de lignage dans l'intestin grêle (*in vivo*). Les souris Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 sont croisées avec des souris Cre-activable Rosa26-LacZ. Initialement, les cellules souches Lgr5⁺ expriment la GFP et une version inactive de la recombinase CRE. Après injection de tamoxifène (12 heures), l'activation de la recombinase CRE permet la transcription de LacZ. Le devenir des cellules souches et de leurs progéniteurs peut être déterminé par un marquage β-galactosidase. (D'après Barker et al., 2007 avec la permission de Nature publishing.) (*c-e*) Analyse histologique de l'activité LacZ dans l'intestin grêle, (*c*) 1 jour après l'induction, (*d*) 5 jours après l'induction et (*e*) 60 jours après l'induction. **(B)** Protocole d'obtention d'organoïdes à partir de cellules souches Lgr5⁺ triées par FACS ou de cryptes. Expansion, *in vitro*, d'organoïdes de côlon humain à partir d'une seule cellule souche EPHB2high de 0 à 13 jours de différenciation. Échelle : 50 µm (Jung et al., 2011). (D'après Li et Clevers, 2012, avec la permission d'Elsevier)

invalidé par une cassette STOP flanquée de deux sites Lox. L'expression de la protéine CRE conduit à la recombinaison des sites Lox et l'excision de la cassette STOP uniquement dans les cellules du lignage d'intérêt. Dans ces conditions, le rapporteur est exprimé de façon permanente dans ces cellules et leurs progéniteurs. Deux gènes CRE peuvent être utilisés pour ces expériences : une CRE constitutive qui est naturellement active ou une CRE inductible qui est généralement fusionnée à un récepteur nucléaire aux hormones, comme le récepteur aux œstrogènes (RE) ou à la progestérone (RP). En absence de ligand, la protéine CRE est maintenue inactive dans le cytoplasme. La présence du ligand (comme le tamoxifène) induit l'activation de la recombinase CRE, qui induit à son tour l'expression du gène rapporteur (Buckingham et Meilhac, 2011 ; Kretzschmar et Watt, 2012). Des expériences de traçage de lignage avec des souris Cre-activable Rosa26-LacZ ont montré que les cellules en position (+4) expriment le marqueur Bmi1 et qu'elles sont capables de générer des clones représentatifs de tous les types cellulaires présents dans l'épithélium (Sangiorgi et Capecchi, 2008). D'autres travaux ont proposé l'existence d'une zone à cellules souches aux positions +1 à +4 correspondant à une population de cellules progénitrices immatures situées à la base des cryptes et

Culture des cellules animales.indd 5 09/06/14 14:55

intercalées entre les cellules de Paneth (Cheng et Leblond, 1974 ; Bjerknes et Cheng, 1981). Ce sont les cellules colonnaires de la base des cryptes (cellules CBC, pour *Columnar Crypt Based Cells*). En se basant sur des expériences similaires de traçage génétique, il a été montré que les cellules CBC exprimaient fortement un récepteur à sept fragments transmembranaires (type 5) couplé aux protéines G riche en leucine (Lgr5) qui reconnaît le facteur de croissance R-spondin nécessaire au maintien de ces cellules *in vitro* (Carmon et al., 2011 ; de Lau et al., 2011). Ces cellules multipotentes (et pour certaines de grande longévité) produisent chaque jour des progéniteurs à l'origine de tous les types de cellules différenciées (Bjerknes et Cheng, 1999 ; Barker et al., 2007). En effet, chaque jour, une cellule CBC (Lgr5 $^{+}$) est capable de produire **16-32** cellules épithéliales différenciées. Chaque crypte contient jusqu'à 15 cellules souches Lgr5^{+}. Il est admis que les cellules CBC représentent les cellules souches « statutaires » des cryptes alors que les cellules en position +4 constituent une population de cellules souches de réserve qui interviendrait pour restaurer les cellules Lgr5^{+} endommagées ou compenser leur perte (Tian et al., 2011). Il existerait donc un équilibre entre les cellules souches Lgr5^{+} et celles à +4 (Bmi1^{+}) (Takeda et al., 2011). D'autres marqueurs de ces cellules souches ont été identifiés sur les cellules CBC : CD133, EphR, Bmi1, Musashi, OlfM4 (Zhu et al., 2009 ; Itzkovitz et al., 2012).

Le micro-environnement des cellules souches, définit comme la « niche », contrôle l'activité et la survie de la population de cellules souches. Il assure ce rôle par l'intermédiaire de signaux moléculaires impliquant l'expression de récepteurs membranaires et la libération de facteurs trophiques par les cellules environnantes ainsi que par le support matriciel. On a longtemps pensé que le mésenchyme épithélial (formé de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de myofibroblastes) qui entoure les cryptes constituait cette niche. Récemment, les cellules de Paneth sont apparues comme de sérieuses candidates pour constituer cette niche (Sato et al., 2011b). Le nombre de ces cellules est constant et identique à celui des cellules souches. En plus de leur rôle bactéricide, ces cellules sécrètent des facteurs trophiques tels que l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), le *Transforming Growth Factor alpha* (TGF-α), Wnt3 nécessaires à la survie des cellules souches *in vitro*. Elles expriment aussi Dll4, un ligand du récepteur Notch présents sur les cellules souches et qu'elles activent du fait de leurs positionnements respectifs à la base des cryptes. D'autre part, la déplétion des cellules de Paneth *in vivo* entraîne la perte des cellules souches Lgr5^{+}. Ces résultats indiquent que les cellules de Paneth constituent un élément indispensable de la niche des cellules souches intestinales.

Basé sur l'identification de marqueurs de cellules souches intestinales tels que Lgr5^{+} et sur la possibilité de cultiver des fragments d'intestin *in vitro* en Matrigel™ (3-Dimensions, 3D), l'équipe de Hans Clevers a mis au point un protocole de culture de ces cellules souches permettant la croissance et le maintien à long terme (jusqu'à plus de 1 an) d'organoïdes (Sato et al., 2009) (**figure 27-3B**). Ces organoïdes possèdent une organisation crypto-villositaire avec une monocouche cellulaire (dépourvue de fibroblastes sub-épithéliaux) contenant des cellules souches et progénitrices, ainsi que l'ensemble des types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Ces organoïdes contiennent plus de quarante cryptes bordant une lumière centrale dans laquelle se projettent des villosités.

Des marqueurs de cellules « souches » sont maintenus lors de la carcinogenèse et le nombre de cellules qui les expriment, est augmenté. Les souris Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 ont été croisées avec les souris flox-APC mutéflox pour induire la formation d'adénomes. Les cellules prélevées dans ces tumeurs sont ensuite triées au **FACS** pour purifier les cellules souches cancéreuses exprimant la GFP. De la même manière que les cellules souches normales, les cellules souches cancé-reuses sont capables de former des structures organoïdes contenant des cellules aux caractères plus ou moins dif-férenciés.

Mode opératoire selon Sato et al. (2009) et Spence et al. (2011)

Matériel

• Souris Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2 de 6 à 12 semaines. La génération et le génotype de ces animaux sont réalisés selon le protocole décrit par Barker et al. (2008).

• Tampon phosphate salin (PBS) : 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4, 2 mM de KH_2PO_4.

Milieu de culture

• Milieu de culture pour les cryptes : Advanced DMEN/F12, EGF (10-50 ng . ml^{-1}), R-spondin (500 ng . ml^{-1}) et Noggin (100 ng . ml^{-1}).

Isolement des cryptes

Les fragments d'intestin grêle sont ouverts longitudinalement et lavés avec du PBS froid. Les tissus sont découpés en morceaux de 5 mm, lavés avec du PBS froid et incubés 30 minutes à 4 °C dans du PBS contenant 2 mM d'EDTA. Après avoir aspiré le milieu avec EDTA, les fragments de tissus sont vigoureusement re-suspendus dans du PBS froid avec une pipette de 10 ml. Après sédimentation, le surnageant qui correspond au villus est éliminé alors que le culot est repris dans du PBS. Plusieurs étapes de remises en suspension vigoureuses et de centrifugations permettent d'enrichir le surnageant en cryptes. Cette fraction est passée sur un tamis cellulaire de 70 µm (BD Bioscience) pour enlever les villus résiduels. La fraction contenant les cryptes est centrifugée 3 minutes à 150-200 g afin d'éliminer les cellules isolées. La fraction finale consiste en une préparation de cryptes pures utilisables directement pour la culture ou pour dissocier et isoler des cellules.

Culture des cellules animales.indd 6 09/06/14 14:55

Formation d'organoïdes à partir de cryptes

Cinq cents cryptes sont mélangées à 50 µl de Matrigel™ (BD Bioscience) et incubées dans des plaques 24 puits à 37 °C (de 30 minutes à 2 heures pour polymériser le Matrigel™). Puis, 500 µl de milieu de culture des cryptes est ajouté. Chaque jour, des facteurs de croissance sont ajoutés au milieu, et celui-ci est changé entièrement tous les 4 jours. Pour leur passage, les organoïdes sont isolés du Matrigel™ et chaque domaine correspondant à une crypte est dissocié mécaniquement avant d'être transféré dans une nouvelle solution de Matrigel™. Le passage des cryptes est réalisé toutes les 1 à 2 semaines avec un ratio de 1:5.

Formation d'organoïdes à partir d'une seule cellule souche

Le faible nombre de ces cellules souches au prorata de l'ensemble des cellules épithéliales les rend difficiles à purifier. La mise en évidence des marqueurs des cellules souches de l'épithélium intestinal a permis de trier ces cellules au FACS et d'obtenir des populations de cellules enrichies en cellules souches. Les cryptes sont incubées en présence de PBS supplémenté avec de la trypsine (10 mg . ml^{-1}) et de la DNase (0,8 µg . $µl^{-1}$) durant 30 minutes à 37 °C. Les cellules dissociées sont passées à travers un tamis moléculaire de 20 µm avant d'être triées par FACS. Les cellules isolées sont collectées dans le milieu de culture des cryptes et enfermées dans du Matrigel™ contenant le peptide Jagged-1 (1 µM) à 1 cellule/puits (plaque 96-puits, 5 µl de Matrigel). Puis, chaque puits est complété avec 100 µl de milieu de crypte contenant du Y-27632 (10 µM), un inhibiteur de la protéine kinase associée à Rho. Chaque jour, des facteurs de croissance sont ajoutés au milieu, et celui-ci est changé entièrement tous les 4 jours.

Applications

Le traitement de pathologies humaines par transplantation d'organes étant limité par la disponibilité de donneurs d'organes et à leur compatibilité, la possibilité de former des organoïdes à partir d'une seule cellule souche ouvre des perspectives en gastro-entérologie et pour la médecine régénérative. Des expériences encourageantes ont été réalisées dans un modèle de rectocolite hémorragique chez des souris traitées au sodium sulphate dextran, où l'injection d'organoïdes améliore l'épithélium intestinal (Li et Clevers, 2012). Des protocoles similaires ont été développés pour former des organoïdes à partir de biopsies humaines d'intestin grêle ou de côlon (Sato et al., 2011a). Les organoïdes ainsi développés à partir des cellules souches intestinales d'un patient pourraient être auto-greffés. En association avec des approches de thérapie génique (qui consiste à introduire des séquences ADN « saines » dans le génome des cellules du patient), le génome défaillant des cellules souches prélevées pourrait être modifié avant la réimplantation des greffons. La séquence d'ADN « saine » pourrait être transférée au niveau cellulaire par infection virale : cette technique est réalisable dans les organoïdes en utilisant soit un rétrovirus, soit un lentivirus (Koo et al., 2012).

Les expériences de traçage de lignage ainsi que la culture d'organoïdes permettent d'apporter des informations importantes sur la hiérarchie cellulaire qui gouverne le développement et l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Ces approches contribuent également à une meilleure compréhension du rôle des cellules souches intestinales, de leur origine, de leur localisation tissulaire, et des mécanismes qui gouvernent leur renouvellement. À l'heure actuelle, le modèle proposé suggère qu'au niveau cellulaire, les cellules souches font des divisions symétriques alors qu'au niveau de l'ensemble des cellules souches, la division serait asymétrique, conduisant à une dynamique stochastique dans laquelle des cellules souches s'expandent ou sont perdues aléatoirement (Lopez-Garcia et al., 2010 ; Snippert et al., 2010).

Cellules prolifératives des cryptes (cellules non transformées)

Le modèle idéal pour étudier les mécanismes qui contrôlent la croissance et la différenciation des cellules intestinales serait un modèle de culture permanente *in vitro* de cellules « normales » capables de se différencier dans certaines conditions. Un tel système existe pour l'épiderme et les cellules hématopoïétiques, mais pas pour les cellules épithéliales intestinales humaines. Le problème majeur pour établir de telles lignées est le faible taux de survie des cellules épithéliales.

Quaroni a été le premier à décrire l'établissement de culture de cellules épithéliales à partir d'intestin grêle de rat (P14), nommées *Intestinal Epithelial Cells* (IEC) : IEC-6, IEC-17 et IEC-18 (Quaroni et al., 1979). Dérivées à partir de différents niveaux du tractus intestinal, ces lignées sont obtenues en gardant les explants flottant dans le milieu et en présence de collagénase pour réduire la croissance des cellules mésenchymateuses. Ces cellules, indifférenciées ont été bien caractérisées et se comportent comme des cellules de cryptes (Kedinger et al., 1987a ; Quaroni et al., 1999). Elles sont non tumorigènes dans les souris *nude*. Elles sont également insensibles aux traitements exogènes connus pour stimuler l'activité des enzymes intestinales *in vivo*, comme les glucocorticoïdes ou l'insuline.

Plus récemment, une approche similaire a été menée chez l'Homme avec des cellules issues de l'iléon d'embryon (SE17-19 de gestation), par traitement à la thermolysine, les HIEC (*Human Intestinal Epithelial Cell*). Ces cellules qui peuvent être maintenues après plusieurs passages expriment des cytokératines et des marqueurs spécifiques des cellules intestinales des cryptes. Elles expriment également des marqueurs spécifiques des cellules souches comme Bmi1, Musashi1 (Benoit et al., 2010). Ces cellules comme les IEC issues de rongeurs sont incapables de se différencier *in vitro*. Pour cela, elles ont besoin d'être placées dans

Culture des cellules animales.indd 7 09/06/14 14:55

un micro-environnement qui mime la situation *in vivo*, en particulier des conditions permettant les interactions cellulaires avec le mésenchyme (**figure 27-4**). Elles peuvent exprimer des marqueurs de différenciation entérocytaire en fonction de la MEC sur laquelle elles adhèrent (Quaroni et al., 1979), des facteurs de croissance présents dans le milieu (Kurokowa et al., 1987) ou lorsqu'elles sont greffées dans la capsule rénale de rats adultes (où elles profitent de signaux trophiques) (Kedinger et al., 1986). Ainsi lorsqu'un feuillet d'IEC est associé avec du mésenchyme intestinal fœtal et ensuite greffé, les IEC donnent des structures similaires à des villus avec les principaux types de cellules épithéliales différenciées. Cette différenciation morphologique s'accompagne de l'expression d'hydrolases spécifiques des bordures en brosse, comme la sucrase ou la lactase. Il a été montré que ces cellules peuvent également être greffées dans la cavité cœlomique d'un embryon de poulet de 2 jours (Viallet et al, résultats non publiés). Après 8 jours, l'explant est observé à la limite des structures embryonnaires et extra-embryonnaires au niveau du cordon ombilical (*voir* figure 27-4). Le tube digestif greffé est vascularisé et l'on distingue la formation de villus. Une caractérisation plus précise des différents types cellulaires reste cependant à faire. Celle-ci sera évaluée à l'aide de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires de l'intestin déjà identifiés et sur la morphologie et l'organisation de l'axe crypte-villus. Les interactions combinées de l'épithélium et du mésenchyme associées à un environnement humoral approprié sont nécessaires pour induire la différenciation des cellules des cryptes.

Les IEC-17 ont par ailleurs tendance à acquérir un statut différencié au fur et à mesure de leurs passages en

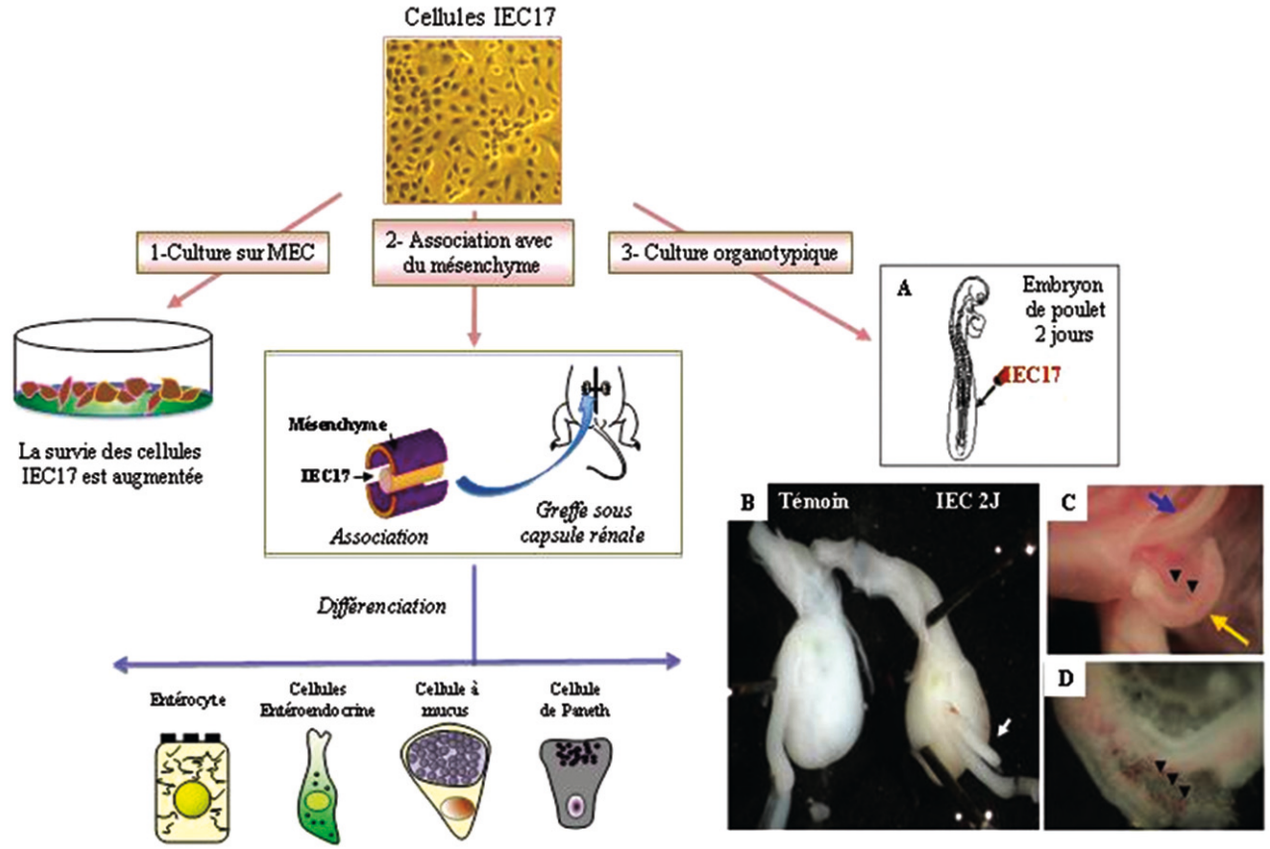


Figure 27-4 **Importance des facteurs environnementaux pour induire la différenciation des cellules IEC17.** L'induction de la différenciation des cellules de la crypte IEC17 nécessite la présence du mésenchyme et de facteurs vasculaires. La culture sur MEC augmente la survie des cellules IEC17, mais n'entraîne pas leur différenciation. Pour induire une différenciation, les IEC-17 sont mises en sandwich entre deux couches de mésenchyme intestinal embryonnaire d'intestin, puis greffées sous la capsule rénale d'un animal adulte. Après 9 jours, on constate que la morphogenèse et la différenciation cellulaire peuvent être complètes avec l'obtention de villus regroupant les quatre types cellulaires : entérocytes, cellules sécrétrices de mucus, cellules endocrines et cellules de Paneth. Pour plus de détails, *voir* Kedinger et al., 1986 ; Simon-Assmann et al., 2007. Nous avons montré que la greffe des cellules IEC17 dans la cavité cœlomique d'un embryon de poulet de 2 jours **(A)** conduit au bout de 8 jours à la formation, au niveau du cordon ombilical, d'un tube digestive surnuméraire vascularisé (flèche jaune, **B** et **C**) qui se distingue facilement du tube digestif de poulet (flèche bleue). Après dissection on distingue la formation de villus dans le tube greffé **(D)**, (flèches noires). Une caractérisation plus précise des différents types cellulaires reste cependant à faire (Jean Viallet, résultats personnels, UJF-INSERM U823, Grenoble).

Culture des cellules animales.indd 8 09/06/14 14:55

culture, probablement en raison du nombre de divisions limité de ces progéniteurs (Sambuy et De Angelis, 1986). L'expression exogène de facteurs de transcription tels que Cdx2, HNF1α ou GATA4 permet d'induire la différenciation des cellules issues de la crypte comme les IEC et les HIEC (Escaffit et al., 2006 ; Benoit et al., 2010).

Mode opératoire : dissection et génération de cellules humaines épithéliales intestinales ou HIEC

La première lignée cellulaire établie à partir de cellules humaines épithéliales de la crypte intestinale, les HIEC, a été réalisée dans le laboratoire de Jean-François Beaulieu (Sherbrooke, Canada), de même que la première culture primaire d'entérocytes différenciés, les PCDE.

Matériels

• Intestins d'embryons humains (SE14-20 de gestation). La stérilité de ces intestins a contribué au succès de la viabilité de la culture de ces cellules.

• Collagène de type 1 de queue de rat (CO I).

Milieux de dissection

• Milieu Leibovitz L-15 additionné de gentamycine (40 µg . ml^{-1}) et nystatine (40 µg . ml^{-1}).

• Tampon phosphate salin (PBS) : 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4, 2 mM de KH_2PO_4.

• Tampon HEPES : 10 mM d'HEPES, 6,7 mM de KCL, 142 mM de NaCL, 1 mM de $CaCl_2$, 0,45 mM de NaCl, pH 7,4.

• Protéase : thermolysine 0,005 % (p/v) dans du tampon HEPES.

Milieux de culture cellulaire

• Milieu DMEM supplémenté avec 20 mM d'HEPES, 10 mM de Glutamax®, 10 ng.ml^{-1} d'EGF, 5 % de SVF (sérum de vœu fœtal décomplémenté 30 minutes à 56 °C).

• Milieu OPTIMEM supplémenté avec 20 mM d'HEPES, 10 mM de Glutamax®, 10 ng . ml^{-1} d'EGF, 5 % de SVF.

Dissection et obtention des cellules HIEC

L'iléon est immergé le plus rapidement possible dans le milieu de dissection. Il est ensuite ouvert longitudinalement et rincé au PBS avant d'être coupé en fragments de 10 mm de long. Les explants sont lavés 2 fois dans du tampon HEPES avant d'être incubés pendant 2 à 3 heures à 37 °C sous agitation dans une solution de thermolysine. Le matériel qui s'est détaché est récupéré par centrifugation (100 g, 7 min), puis rincé deux fois avec du tampon HEPES. Les culots sont re-suspendus dans 10 ml de milieu DMEM complet, puis mis en culture dans une ou deux boîtes de culture de 100 mm. Après 90 minutes d'adhérence, le milieu contenant les cellules non adhérentes est transféré dans une nouvelle boîte de culture. Le milieu de culture est changé toutes les 48 heures Deux types de colonies sont observables : les colonies de cellules épithéliales non prolifératives qui dégénèrent en quelques jours et des paquets de cellules « épithéloïdes » qui s'étalent rapidement pour remplir la boîte après 10 à 15 jours. La confluence est atteinte au bout de 2 à 3 semaines ; cet état coïncide avec l'acquisition d'une morphologie de cellules épithéliales.

Culture de HIEC

Les cellules confluentes sont dissociées par la trypsine 5 minutes à température ambiante, puis ensemencées en milieu Opti-MEM (lequel améliore la vitesse de croissance des HIEC comparé au milieu DMEM). À chaque passage les cellules sont diluées au 1:2 ou 1:3. Les cellules peuvent être maintenues en culture jusqu'au 28e passage avant qu'elles ne deviennent sénescentes.

Applications

La production de culture cellulaire IEC ou HIEC capables de conserver les propriétés des cellules des cryptes durant un nombre important de passages constitue un outil important pour étudier *in vitro* différents processus et fonctions tels que la prolifération cellulaire (Perreault et Beaulieu, 1996 ; Ruemmele et al., 1998), l'apoptose (Ruemmele et al., 1999a ; Ruemmele et al., 1999b), l'importance des interactions entre les cellules et la MEC dans le devenir des cellules des cryptes (Desloges et al., 1998 ; Simoneau et al., 1998 ; Basora et al., 1999) ou le métabolisme lipidique (Levy et Bendayan, 2000 ; Levy et Ménard, 2000).

Les expériences de greffes d'IEC (Kedinger et al., 1986) ou d'expression forcée de cdx-2 (Suh et Traber, 1996) suggèrent que les cellules comme les HIEC possèdent des propriétés de cellules souches et représentent un modèle intéressant pour déterminer les signaux qui gouvernent leur devenir. Le fait de pouvoir modifier l'expression d'un gène dans des cellules présentant des caractéristiques souches constitue un outil important pour étudier sa fonction. L'introduction d'une séquence d'ADN dans la cellule peut se faire par électroporation ou par infection virale. Ainsi, l'expression ectopique du gène *ngn3* (codant pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation endocrine) dans des progéniteurs endodermiques par adénovirus favorise la différenciation entéro-endocrine aux dépens des cellules entérocytaires (Jenny et al., 2002). L'infection adénovirale couplée à une digestion enzymatique par la dispase (qui sépare légèrement les cellules épithéliales rendant plus accessibles les récepteurs aux adénovirus) augmentent significativement l'introduction de gènes exogènes dans l'endoderme intestinal (Quinlan et al., 2006). La culture organotypique *in ovo* du tube digestif est également un outil précieux pour étudier l'ontogenèse du tube digestif sans passer par l'intermédiaire de la production d'animaux transgéniques conditionnels, approche très lourde. Les cellules IEC peuvent être modifiées génétiquement par transfection stable avant d'être greffées dans l'embryon de poulet. Ainsi nous pouvons directement apprécier les effets de l'expression d'une protéine modifiée ou non (formes dominantes négatives ou positives) ou l'inhibition de son expression sur la différenciation intestinale dans un contexte physiologique.

Culture des cellules animales.indd 9 09/06/14 14:55

Cellules épithéliales intestinales immortalisées

L'utilisation de souris transgéniques porteuses d'un oncogène placé sous le contrôle de séquences régulatrices d'un gène d'expression spécifique de tissu offre la possibilité de dériver des cellules différenciées d'origine diverse. Un clone de cellules épithéliales, m-ICcl2, a été obtenu après microdissection d'explants de la partie inférieure de villosités d'embryons de souris transgéniques L-PK-Tag1 (L-Type pyruvate kinase) de 20 jours (Bens et al., 1996). Cette souris exprime le transgène thermosensible SV40 Tag (*Simian Virus 40 large Tumor antigen*) dans le foie, l'intestin grêle, le rein et le pancréas endocrine. Ces cellules ne sont pas tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris *nude*. À confluence, elles forment une monocouche de cellules cuboïdes maintenues par des jonctions serrées (marquage ZO-1). Ces cellules présentent un phénotype polarisé avec des bordures en brosses rudimentaires au pôle apical. Outre les caractères de différenciation épithéliale intestinale villositaire (villine, cytokératine, hydrolases), ces cellules conservent des propriétés propres aux cellules des cryptes : accumulation intracellulaire de sucrase-isomaltase, expression du CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), sécrétion de chlore par l'activité d'un canal chlore fonctionnel. Ces cellules immatures peuvent être différenciées vers le lignage entéro-endocrine en forçant l'expression du gène pro-endocrine ngn3 (Simon-Assmann et al., 2007). Elles peuvent également être utilisées pour des études d'activité transcriptionnelle (présence d'élément activateur Cdx dans le promoteur de chemokine CCL25) (Ericsson et al., 2006).

L'immortalisation de culture primaire avec des oncogènes peut être réalisée par infection virale. L'utilisation du mutant thermosensible SV40 Tag permet la croissance des cellules immortalisées uniquement à la température permissive et induit leur différenciation après exposition à une température plus élevée. Cette stratégie a d'abord été appliquée à des cellules intestinales embryonnaires de rat (Paul et al., 1993) : ces cellules prolifèrent à 32 °C, mais adopte un phénotype « normal » à 39 °C (température non permissive). Les niveaux de différenciation obtenus sont variables selon les paramètres de culture. Ce modèle a été adapté à l'intestin embryonnaire humain par Quaroni et Beaulieu en 1997 (Quaroni et Beaulieu, 1997) qui ont dérivé une lignée de cellules épithéliales intestinales immortalisées à partir d'intestin grêle humain fœtal appelée : cellules tsFHI. Tous les clones expriment des marqueurs identiques à ceux des HIEC, incluant l'expression de cytokératines, les enzymes des bordures en brosses telles que l'aminopeptidase N et la dipeptidylpeptidase IV et le marqueur des cryptes MIM-1/39. Le transfert de ces cellules à 39 °C entraîne des changements morphologiques et fonctionnels reliés à l'acquisition d'un phénotype plus différencié. Il s'agit de la perte irréversible du potentiel prolifératif corrélé à l'induction de p21waf/Cip1 (inhibiteur de *cyclin dependent kinase*) et l'augmentation de la fréquence des cellules différenciées (expression et relocalisation des protéines des jonctions intercellulaires, microvillosités denses et induction de la sucrase-isomaltase) (Pageot et al., 2000). Ce modèle a également été utilisé pour étudier l'expression d'autres régulateurs du cycle cellulaire au cours des phases de prolifération, mais aussi de différenciation précoce et tardive des cellules épithéliales (Tian et Quaroni, 1999).

Les cellules tsFHI représentent un modèle d'étude *in vitro* de la différenciation intestinale comparable au processus qui a lieu *in vivo* dans les cryptes.

Mode opératoire : culture primaire de cellules épithéliales intestinales

Milieu de culture cellulaire

• Milieu DMEM/Ham-F-12 supplémenté avec 60 nM de sodium sélénate, de la transferrine (5 µg . ml^{-1}), 2 mM de glutamine, 50 nM de dexaméthasome, 1 nM de triiodothyronine, de l'insuline (5 µg . ml^{-1}), 20 mM de D-glucose, 10 nM d'EGF, 2 % de SVF, 20 mM d'HEPES.

Dissection et culture cellulaire

Des segments d'intestin d'embryons de 20 jours sont finement coupés et incubés pendant une heure à 37 °C dans du milieu DMEM/Ham-F-12 contenant 0,1 % de collagénase. Les cellules dissociées sont ensemencées dans des puits recouverts de CO I et cultivées du milieu DMEM/Ham-F-12 complet dans une atmosphère à 5 % de CO_2.

Cellules différenciées dérivées des villosités intestinales (cellules non transformées)

Certaines méthodes de purification des cellules épithéliales intestinales permettent d'obtenir une fraction épithéliale relativement pure (faible contamination par des fibroblastes). Cependant, leur utilisation est limitée par le faible taux de survie de ces cellules et la perte du phénotype différencié (Fonti et al., 1994 ; Perreault et Beaulieu, 1996). Ces méthodes reposent sur l'utilisation d'enzymes ou de chélateurs des cations divalents indispensables au maintien des jonctions cellule-cellule et cellule-MEC. Ces méthodes induisent des dommages cellulaires importants et induisent une apoptose massive et rapide des cellules de l'intestin et du côlon de rongeurs (Sträter et al., 1996 ; Grossmann et al., 1998). L'utilisation d'une méthode sans chélateur ni protéolyse comme le MatriSperse™ (BD Bioscience) permet d'établir des cultures primaires de cellules épithéliales intestinales différenciées non transformées (PCDE) à partir de tissus fœtaux humains (Perreault et Beaulieu, 1998) ou de rat (Fukamachi, 1992). Avec la lignée cellulaire NCM460, elles constituent les principaux modèles d'étude *in vitro* de la barrière épithéliale dont les cellules ne sont pas transformées.

Culture des cellules animales.indd 10 09/06/14 14:55

Mode opératoire : dissection et obtention d'une culture primaire d'entérocytes différenciés (PCDE) (Perreault et Beaulieu, 1998)

Dissection et obtention des cellules PCDE

Des explants de 5 × 5 mm sont isolés à partir d'iléons d'embryons humains (SE14-20 de gestation) et immergés dans 5 ml d'une solution de Matrisperse™ (BD Biosciences) froide et non diluée pendant 8 à 10 heures sans agitation. Le Matrisperse™ est une solution commerciale qui permet la dissociation complète de l'épithélium du mésenchyme sous-jacent. Cette étape se fait sur la glace par agitation douce pendant 10 minutes (**figure 27-5A**). Le matériel détaché du Matrisperse™ est collecté par centrifugation (100 g, 7 min) et lavé deux fois avec du PBS. Le culot est re-suspendu doucement afin d'endommager le moins possible les structures en doigts de gants. Il est finalement repris dans 6 ml de milieu DMEM complet et ensemencé dans des boîtes de cultures (2 à 3 boîtes de 60 mm) ou en LabTeck™ (8 puits) sur lesquels a été déposée une solution de CO I (50 µg/cm^2). Les boîtes sont laissées à 4 °C pendant 24 heures afin de favoriser l'adhérence cellulaire. L'analyse des fractions de cellules épithéliales récupérées et du mésenchyme restant pour différents marqueurs spécifiques de l'un ou l'autre des tissus confirme la pureté relative de chacune des fractions.

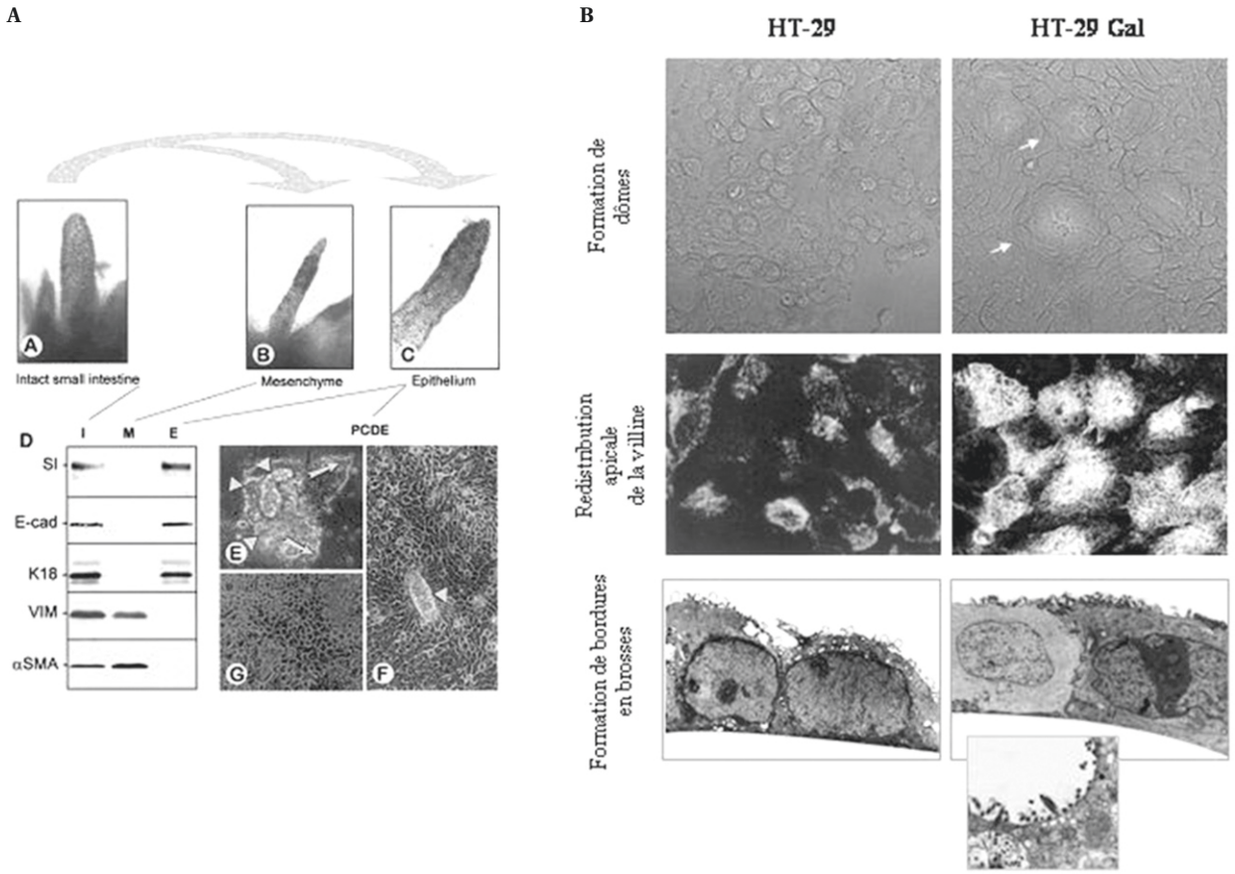


Figure 27-5 **Obtention, caractérisation et culture des cellules PCDE. (A)** Les cellules PCDE sont obtenues à partir d'iléons d'embryons humains dissociés dans du « Matrisperse ». (*a-c*) Micrographies en contraste de phase de l'apparence gonflée et typique d'un villus après 9 heures d'incubation dans du Matrisperse™ sans agitation. Après agitation, le mésenchyme (*b*) se sépare du revêtement épithélial (*c*). (*d*) Analyse par Western Blot de l'intestin entier (I), du mésenchyme séparé (M) et de la fraction épithéliale (E) pour la recherche de sucrase-isomaltase (SI), de la E-cadhérine (E-cad), de la kératine 18 (K18), de vimentine (VIM), et de la sous-unité α de l'actine de muscle lisse de souris (α-SMA) pour confirmer la pureté des fractions épithéliales et mésenchymateuses. (*e-g*): micrographies en contraste de phase montrant la fraction épithéliale en culture. Après 24 heures, les cellules ont adhéré et commencent à s'étaler (*e*) pour atteindre la confluence et commencer à dégénérer après 10 à 12 jours de culture (*f-g*). *D'après* Perreault et Beaulieu (1998), avec l'autorisation de John Wiley et Sons. **(B)** Changements morphologiques liés à la différenciation des cellules HT-29 vers la voie entérocytaire : les cellules HT-29 sont mises en différenciation 10 jours en présence de galactose (HT-29 Gal). Image de microscopie photonique à transmission mettant en évidence la formation de dômes (images du haut), la redistribution apicale de la villine (marquage immunofluorescent de la villine) au niveau des bordures en brosses plus ou moins denses selon le stade de différenciation (microscopie électronique) avec présence de cystes bordés de villosités (encadrement du bas) (Gout et al., 2004).

Culture des cellules animales.indd 11 09/06/14 14:55

Culture de PCDE

Après 24 heures, le milieu de culture qui contient le matériel non adhérent est éliminé. La surface de la culture est rincée avec du milieu frais pour bien éliminer les débris cellulaires et le milieu de culture est changé toutes les 48 heures L'observation au microscope à contraste de phase après 24 heures de culture montre que les fragments de villus ont adhéré et commencent à s'étaler. L'étalement se poursuit durant les 2 à 3 jours suivants jusqu'à la confluence cellulaire. Les PCDE peuvent être maintenues ainsi 9 à 10 jours avant que les premiers signes de dégénération se manifestent. L'analyse en microscopie électronique des PCDE au bout de 6 à 7 jours montre une population mixte de cellules absorbantes et de cellules de gobelet (Pageot et al., 2000).

Caractérisation des cellules épithéliales

Plusieurs critères (morphologiques, structuraux, enzymatiques, expression génique…) peuvent être utilisés pour caractériser le phénotype des cellules épithéliales isolées. Il est important que les cellules cultivées qu'elles soient issues de cultures primaires ou de lignées, reproduisent les caractéristiques cellulaires proches du tissu d'origine. Certaines de ces caractéristiques ainsi que les techniques associées à leur identification sont répertoriées dans le **tableau 27-II**.

Tableau 27-II Les différents marqueurs des cellules épithéliales et mésenchymateuses de l'intestin.

	Marqueurs	Techniques associées	Nature de la cellule
Taux de prolifération	Synthèse d'ADN	• Incorporation de thymidine tritiée ou de BrdU	Cellules des cryptes et des villus
	Temps de doublement	• Comptage cellulaire	
	AntigèneKi67		
Marqueurs structuraux	Filaments intermédiaires : kératine-8, -18, -19 et -20	• IF • ICH • PCR • WB	Cellules épithéliales
	Vimentine Sous-unité α de l'actine de muscle lisse de souris (aSMA)		Cellules mésenchymateuses (Fritsch et al., 1997 et 1999)
Marqueurs enzymatiques ou métaboliques	Antigène MEM-1/39 (MIM) (granules de sécrétion)	• Activité enzymatique (Chantret et al., 1994) • WB et PCR (Le Beyec et al., 1997)	Cellules des cryptes
	Animopeptidase N, dipeptidylpeptidase IV		Entérocytes
	Sucrase-isomaltase		
	Phosphatase alcaline		
	Apolipoprotéines A-IV ou B FABP-1 Lactate-phlorizin hydrolase Maltase glucoamylase		
Protéines des jonctions cellulaires	E-cadhérine Zo-1 Protéines des desmosomes ZK31 Tricelluline	• IF • PCR • WB	Cellules épithéliales
Sécrétion de mucus		• Anticorps anti-mucines intestinales : IF et ICH (Bara et al., 1984) • Coloration au bleu d'Alcian ou a l'acide periodique de Schiff (Le Beyec et al., 1999)	Cellules à mucus (gobelet)
Expression génique	Exemples : Cdx, HNF, sox…	• IF • PCR • WB	Cellules des cryptes et des villus

IF : immunofluorescence ; ICH : immunohistochimie ; PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; WB : *Western Blot*.
(Bara et al., 1984 ; Chantret et al., 1994 ; Fritsch et al., 1997 ; Le Beyec et al., 1997 ; Fritsch et al., 1999 ; Le Beyec et al., 1999)

Culture des cellules animales.indd 12 09/06/14 14:55

Applications

Ces cellules constituent le pendant non transformé des lignées d'adénocarcinomes coliques HT-29 et Caco-2 lorsqu'elles sont différenciées. Comme elles sont relativement faciles à produire, elles peuvent être utilisées dans de multiples applications telles que l'étude du métabolisme et des fonctions d'absorption et de digestion *in vitro*, et leur régulation par des facteurs de croissances, des cytokines ou des interactions cellules-cellules ou cellules-MEC. Elles peuvent également servir à l'étude du transport des nutriments ou de drogues. Enfin, puisque ces cellules ne prolifèrent plus, elles peuvent être utilisées pour étudier le phénomène de restitution lors d'expérience de blessure-cicatrisation (Ciacci et al., 1993 ; Dignass et Podolsky, 1993 ; Lotz et al., 1997).

Lignées d'adénocarcinomes : modèles de la différenciation épithéliale

La première lignée de carcinome colique humaine, HT-29, a été établie en 1964 par Jorgen Fogh. En 1977, 127 lignées cellulaires furent dérivées à partir de cancers colorectaux humains (Fogh et al., 1977). Comme la tumeur d'origine, ces lignées cellulaires varient beaucoup dans leur stade de différenciation, dans leur pouvoir prolifératif ou leurs propriétés métaboliques. Les principales lignées utilisées sont répertoriées dans le **tableau 27-III**. Dans les

Tableau 27-III Différenciation et caractéristiques phénotypiques de différentes lignées d'adénocarcinomes coliques (Fogh et Trempe, 1975)

Lignes d'adénocarcinomes coliques	Différenciation	Propriétés
HT-29 (Fogh et al., 1975)	Possible si : – carence en glucose – en présence de butyrate de sodium – sous l'action de drogues anticancéreuses	Population hétérogène composée de : • cellules indifférenciées poussant en multicouches • cellules présentant des critères de différenciation : – Cellules polarisées autour de la lumière interne de la multicouche cellulaire avec ou non une bordure en brosse – cellules présentant une bordure en brosse apicale – cellules sécrétant du mucus
Caco-2 (Fogh et al., 1975)	– spontanée à confluence – induite par culture sur MEC	Cellules qui poussent en monocouche de cellules polarisées et qui expriment plusieurs protéines associées au métabolisme glucido-lipipdique des entérocytes
T84 ou HC84S (Murakami et al., 1980)	Pas de caractéristique de différenciation les rapprochant d'un des types cellulaires présents au niveau de l'épithélium intestinal	À confluence ces cellules forment une monocouche de cellules polarisées : – absence de bordure en brosse – absence de sécrétion de mucus – transport électrolytique (présence de dômes) et transport de chlore (utilisée pour l'étude de l'expression du gène CFTR) – résistance trans-épithéliale élevée quand elles sont cultivées sur du collagène de type 1
SW480 (Lebowitz et al., 1976)	Très faible en culture	Cellules polyploïdes : – qui synthétisent des faibles quantités d'antigène carcino-embryonnaire (CEA) – de forme polygonale qui présentent de rares villosités – qui développent des tumeurs de type colique quand elles sont injectées à des souris nude
LS-174T Variant de la trypsination de la lignée LS-180 (Tom et al., 1976	Cellules peu différenciées, non polarisées avec une faible cohésion du tapis cellulaire	Cellules qui produisent une grande quantité d'antigène CEA : – absence de E-cadhérine – pas de mutation du gène APC
HCT-8 (HRT-18) (Tpmkins et al., 1974)	Morphologie épithéliale	Cellules qui produisent une grande quantité d'antigène CEA et qui expriment de la phosphatase alcaline et de la kératine

Culture des cellules animales.indd 13 09/06/14 14:55

conditions de culture standard, la plupart de ses lignées sont incapables de se différencier. Toutefois, dans des conditions de culture particulières, certaines de ces lignées, les Caco-2, les HT-29 ou les T84, peuvent adopter un phénotype d'entérocytes ou de cellules à mucus (Chantret et al., 1988 ; Saaf et al., 2007). Ces lignées constituent des modèles d'étude *in vitro* qui permettent de caractériser les mécanismes impliqués dans la mise en place de la barrière épithéliale et ceux conduisant à son altération lors de processus pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La lignée Caco-2

Les cellules Caco-2 se différencient spontanément vers un phénotype entérocytaire à partir de la confluence des cellules en culture (Pinto et al., 1983). Ainsi aux stades précoces de culture, les cellules sont indifférenciées alors que 20 à 40 jours après la confluence, elles forment une monocouche de cellules polarisées avec des microvillosités apicales et établissent des contacts intercellulaires (jonctions serrées). Contrairement aux cellules coloniques humaines, les Caco-2 différenciées expriment des enzymes normalement présentent dans les villosités de l'intestin grêle comme des disaccharidases ou des peptidases (Hauri et al., 1985 ; Beaulieu et Quaroni, 1991 ; Vachon et Beaulieu, 1992). Elles assurent également le transport ionique et de l'eau au niveau de la membrane basolatérale, formant des dômes en culture (Pinto et al., 1983) (**figure 27-5B**). Environ 36 clones ont été isolés à différents passages de la lignée parentale dans le but d'isoler des populations plus homogènes avec un meilleur potentiel de différenciation entérocytaire. Ils diffèrent surtout pour leur taux de sucrase-isomaltase et la consommation de glucose. Les deux clones les plus utilisés sont les Caco-2/TC7 et les Caco-2/15, les cellules TC7 exprimant le plus fort taux de sucrase (Chantret et al., 1994). Toutes ces propriétés font que la lignée Caco-2 est un outil précieux pour l'étude des événements moléculaires associés à la polarité cellulaire, la biogénèse enzymatique et le transport de molécules. Cependant bien qu'elles ressemblent à des entérocytes, ces cellules sont malignes et présentent des mutations sur plusieurs gènes comme p53, APC, β-caténine et smad (Gayet et al., 2001).

En 1997, Kerneis et al. ont montré grâce à des expériences de co-culture en inserts (favorisant la déposition de MEC et la polarisation) que les cellules Caco-2 différenciées peuvent se transdifférencier en cellules M. Les cellules Caco-2 sont ensemencées sur la face inférieure d'un filtre (pores 3 µm) et cultivées jusqu'à la différenciation (formation d'une bordure en brosse). Des lymphocytes sont ajoutés dans la chambre supérieure face au pôle basal des cellules Caco-2 et co-cultivés pendant 7 jours. Les lymphocytes traversent les pores du filtre et pénètrent dans la monocouche de cellules Caco-2 sans altérer leur polarité. Cependant, les cellules Caco-2 acquièrent des propriétés communes aux cellules M à savoir : une désorganisation des bordures en brosse, une perte d'activités enzymatiques, la capacité de transporter des bactéries telles que *Vibrio cholera*. Ces résultats montrent que des entérocytes sont capables de se convertir en cellules M (Kerneis et al., 1997 ; Kerneis et Pringault, 1999).

La lignée HT-29

L'intérêt des cellules HT-29 réside dans le fait que, selon les conditions de culture, on peut dériver des sous-populations et des clones cellulaires correspondant à différents phénotypes : des cellules absorbantes (entérocytes du côlon) ou des cellules sécrétrices de mucus (cellules de gobelet). Contrairement aux cellules Caco-2, la lignée d'adénocarcinome colique HT-29 est considérée comme une lignée pluripotente. Dans les conditions de culture standard (glucose et SVF), les cellules HT-29 conservent un phénotype indifférencié. Elles se développent sous forme de multicouches de cellules non polarisées et n'expriment pas de marqueurs fonctionnels des cellules épithéliales. Cependant, lorsque les conditions de culture sont changées ou en présence d'inducteurs de la différenciation, elles adoptent un phénotype de cellules épithéliales intestinales différenciées (**figure 27-6**) :

— une carence métabolique (carence en glucose ou en glutamine) ou l'utilisation d'une autre source de carbone (substitution du glucose par du galactose, utilisation d'inosine ou d'uridine) conduit à une différenciation de la lignée parentale HT-29 vers le phénotype « côlonocytes ». Elles expriment certaines enzymes des bordures en brosse, mais avec des activités beaucoup plus faibles que celles des cellules de l'intestin grêle ou des Caco-2 dont la différenciation est plus proche des entérocytes (Zweibaum, 1993 ; Lenaerts et al., 2007). Elles se caractérisent par la formation de dômes et de bordures en brosse plus ou moins denses et riches en villine (*voir* figure 27-5C) ;

— le traitement de la lignée parentale par le butyrate de sodium (BtNa) a permis d'enrichir une population mixte – de cellules absorbantes et de cellules sécrétrices de mucus – et d'isoler à plus forte concentration de BtNa un clone sécréteur de mucus – le clone HT-29/16E (Augeron et Laboisse, 1984) ;

— l'utilisation de substances anticancéreuses permet aussi la différenciation des cellules HT-29. En présence de méthotrexate (MTX, 10^{-7} M), elles forment une population mixte de cellules absorbantes ou cellules de goblet. À des concentrations plus fortes (10^{-5} à 10^{-6} M), elles forment uniquement des cellules de gobelet sécrétant des mucines gastriques (Lesuffleur et al., 1990). Cependant, l'utilisation d'une concentration de MTX comprise entre 10^{-3} et 10^{-4} M entraîne en changement de différenciation de la forme mucosécrétrice au phénotype absorbant. Ce changement coïncide avec une forte amplification du gène codant pour une enzyme cible du MTX, la dihydrofolate réductase (Lesuffleur et al., 1991b). De la même façon, l'adaptation des cellules HT-29 au 5-fluoro-uracile (5-FU) conduit à l'émergence d'une population mixte : de cellules polarisées

Culture des cellules animales.indd 14 09/06/14 14:55

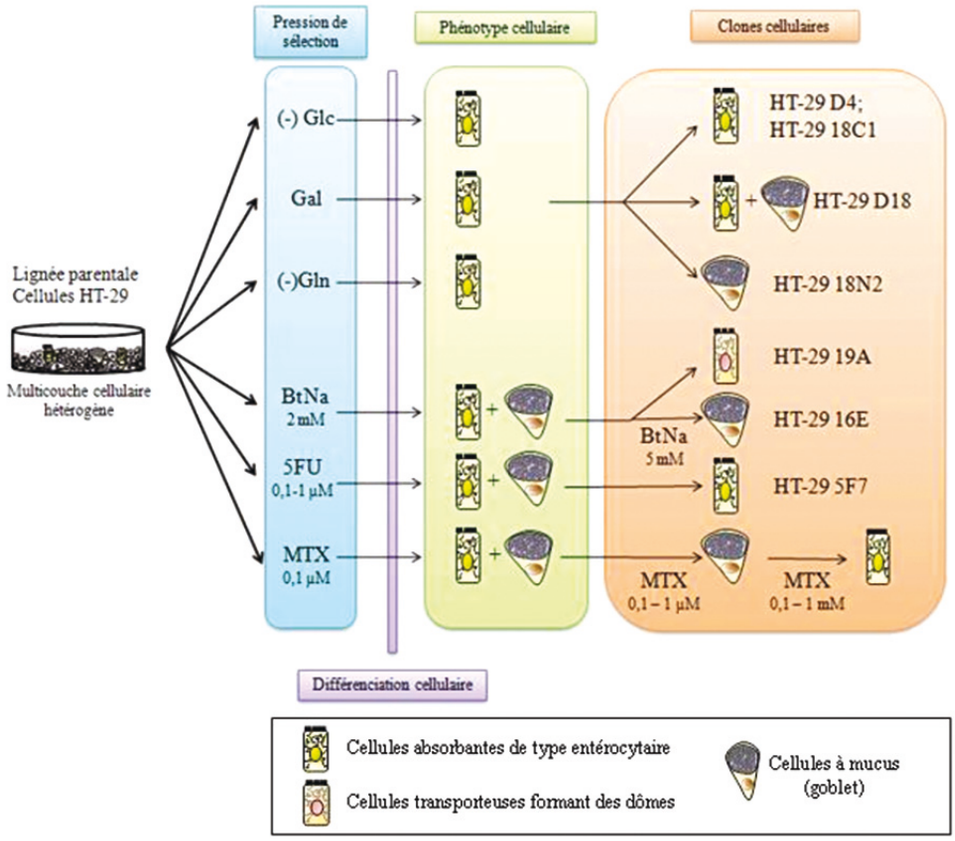


Figure 27-6 **Sous-population et clones de cellules différenciées isolées à partir de la lignée parentale HT-29.** La différenciation des cellules HT-29 peut être induite par une carence en glucose (–Glc) ou en glutamine (–Gln), une substitution du glucose par du galactose (Gal), ou par traitement avec du butyrate de sodium (BtNa) ou des agents anti-cancéreux comme le 5-fluoro-uracile (5-FU) ou le méthotrexate (MTX). Les différents phénotypes obtenus sont les cellules entérocytaires, les cellules à mucus ou les cellules transporteuses formant des dômes.

formant des dômes et des cellules de gobelet qui sécrètent des mucines côloniques. La résistance au 5-FU est associée à l'amplification du gène de la thymidylate synthétase (Lesuffleur et al., 1991a).

Mode opératoire : culture des lignées d'adénocarcinomes coliques

Milieux de culture cellulaire

• **Caco-2**. Milieu DMEM (4,5 g/l glucose) supplémenté avec 20 % de SVF (préalablement décomplémenté 30 minutes à 56 °C), 1 % d'acides aminés non essentiels et un mélange de pénicilline/streptomycine aux concentrations finales respectives de 100 U . ml^{-1} et 0,1 mg . ml^{-1}.

• **HT-29**. Milieu DMEM (4,5 g/l glucose) supplémenté avec 10 % de SVF (préalablement décomplémenté 30 min à 56 °C), et un mélange de pénicilline/streptomycine aux concentrations finales respectives de 100 U . ml^{-1} et 0,1 mg . ml^{-1}.

Les lignées cellulaires d'adénocarcinomes coliques humaines sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO_2.

Pour déclencher la différenciation cellulaire, ce milieu standard peut subir des modifications. Cependant, quelle que soit la pression initiale exercée, une fois la sélection opérée et la croissance de la population cellulaire obtenue stabilisée, les cellules gardent leur capacité de différenciation lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu standard (en présence de glucose ou en absence de drogues). Ainsi, les sous-populations et clones issus de la lignée HT-29 sont cultivés en présence de 10 % de SVF et en DMEM à forte teneur en glucose. Pour certaines expériences nécessitant une prolifération cellulaire plus importante ou des conditions plus favorables à la migration ou l'invasion, le DMEM peut être remplacé par du RPMI.

Passage des cellules

Ces cellules sont passées régulièrement en utilisant 0,125 % de trypsine/0,5 mM d'EDTA dans du PBS dépourvu de calcium et magnésium (5 à 10 min à 37 °C). Ces cellules formant des complexes jonctionnels rapidement, il faut impérativement bien les séparer les unes des autres pour que les repiquages soient reproductibles. Les cellules sont comptées en cellules de Mallassez ou Neubeuer. Les

Culture des cellules animales.indd 15 09/06/14 14:55

cellules sont ensemencées à une densité de 10 000 cellules/cm^2. Le milieu est changé 48 heures après repiquage, puis tous les deux jours pour les cellules HT-29 et tous les jours pour les Caco-2.

Cultures sur filtres semi-perméables

Les cellules Caco-2 sont ensemencées (5×10^4 cellules/insert d'une plaque 24 puits) sur des inserts dont la base est constituée d'un filtre poreux (pores de 1 µm de diamètre). Ces inserts sont recouverts ou non de MEC (native produite par des cellules mésenchymateuses ou purifiée). L'existence de deux compartiments individualisés, l'un apical et l'autre basal, permet, à partir de la confluence, l'apport asymétrique de nutriments ou d'hormones et la modulation des concentrations de glucose et de sérum entre les deux pôles (Le Beyec et al., 1997). Jusqu'à la confluence, le même milieu standard doit être mis en haut et en bas. À partir de la confluence, il ne faut ne plus mettre de sérum dans le milieu apical pour se rapprocher de l'asymétrie physiologique.

Applications

En raison de leur diversité, les lignées d'adénocarcinomes coliques (qui diffèrent selon leurs caractéristiques et leurs propriétés) constitue des modèles intéressants pour étudier les différentes facettes de la biologie cellulaire de l'épithélium digestif. Elles ont déjà contribué à l'obtention de nombreux résultats portant sur la polarité cellulaire, la synthèse et l'adressage des glycoprotéines membranaires (par exemple, les hydrolases), ainsi qu'à une meilleure compréhension des mécanismes mis en place lors de l'acquisition de propriétés structurales tels que les microvillosités apicales (polarisation du cytosquelette), l'endocytose et le transport de macromolécules, l'adhésion, la pénétration de pathogènes. La grande variété des récepteurs exprimés à la surface de ces cellules permet d'activer de nombreuses voies de signalisation qui contrôlent la maturité et le fonctionnement des cellules épithéliales : il s'agit de récepteurs pour des molécules régulatrices provenant du système neuroendocrinien (peptide vasoactif, neuropeptide Y, acétylcholine…), des récepteurs pour les glucocorticoïdes, des récepteurs pour les molécules d'adhérence. L'expression de ces récepteurs est souvent dépendante du stade de différenciation. Ces lignées permettent de déterminer quels sont les facteurs et les voies de signalisation qui contrôlent l'émergence des divers types cellulaires, en particulier les cellules absorbantes et les cellules de gobelet.

La lignée Caco-2 a souvent été utilisée comme modèle d'étude pour l'absorption intestinale, un facteur important pour déterminer le succès d'un traitement oral, en particulier la perméabilité de l'épithélium à une drogue (Hidalgo et al., 1989). Plusieurs travaux ont permis d'établir une corrélation entre la perméabilité des Caco-2 *in vitro* (*P* app) et la biodisponibilité et le transport de la drogue *in vivo* (Artursson et Karlsson, 1991).

Pour ces études, l'utilisation de lignées cellulaires plutôt que des cultures primaires offre certains avantages :

— l'obtention d'une population homogène de cellules et la reproductibilité des résultats si les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions (milieux, support, nombre de passages, densité cellulaire, jour de culture après ensemencement à la même densité) ;

— une capacité de prolifération plus importante que les cultures primaires (amplification du matériel) ;

— clonage selon différents critères : métaboliques, expression de gène, caractères morphologiques, résistances ou adaptation aux drogues anticancéreuses ;

— la possibilité de maintenir les cultures cellulaires sur du long terme.

Ces lignées sont également beaucoup utilisées pour étudier les mécanismes impliqués dans le développement et la progression tumorale, mais aussi dans le traitement du cancer. Ces différents axes d'étude sont liés au fait que ce panel de lignées cellulaires transformées couvre la grande diversité de caractéristiques observées dans les tumeurs primaires en termes de localisation (cæcum, côlons droit, transverse, gauche, rectum ou métastases), de présence de mutations (APC, β-caténine, KRas, P53, TGF-β), du grade tumoral (Duke's stage A à C), de résistance aux traitements de chimiothérapie (5-FU, MTX…) ou de capacité d'invasion et de migration (de Both et al., 1999) (**tableau 27-IV**). D'autre part, le fait que ces lignées présentent le même répertoire d'altérations génétiques que les tumeurs primaires est un atout pour étudier les changements biologiques et pharmacologiques associés à une altération génétique particulière (Gayet et al., 2001). Ces modèles contribuent également à une meilleure compréhension de la dynamique des interactions cellules-cellules ou cellules-MEC dans la migration cellulaire, la prolifération et la tumorigenèse (Stutzmann et al., 2000).

Régulation des fonctions de la barrière épithéliale

Par le mésenchyme et la matrice extracellulaire

L'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire (MEC) est d'une importance fondamentale dans plusieurs processus biologiques comme le développement, la croissance ou la différenciation cellulaire. Ce réseau de MEC comprend la matrice interstitielle (retrouvée dans le tissu connectif) et la lame basale qui est une spécialisation de la MEC. Il s'agit d'un feuillet qui souligne les épithéliums, les endothéliums et la plupart des cellules musculaires, adipeuses et nerveuses (Miner et Yurchenco, 2004). Il contribue à l'organisation tissulaire et à sa stabilité (rôle de soutien), mais a également un rôle actif dans les processus de morphogenèse, de prolifération et de différenciation. La

Culture des cellules animales.indd 16 09/06/14 14:55

Tableau 27-IV Caractéristiques génétiques d'un échantillon non exhaustif de lignées cellulaires colorectales couramment utilisées en laboratoire.

	Stade tumoral	MutationC/LOH			Ploïdie	Instabilité	
		P53	APC	Ras		MIN	CIN
HT-29	Adénocarcinome	mut	mut	mut	Triploïdie		+
Caco2	Adénocarcinome	mut			Hyper-tétraploïdie		+
SW48	Duke's C	wt	wt		Proche diploïdie	+	
SW480	Duke's B	mut	mut	mut	Hyper-diploïdie		+
SW620	Duke's C (métastase)	mut	mut	mut	Hyper-diploïdie		+
DLD1	Duke's C	mut	mut	mut	Diploïdie	+	
Lovo	Duke's C grade IV (métastase)	wt	wt		Proche diploïdie	+	
HCT116	Adénocarcinome	wt	wt	mut	Proche diploïdie	+	
T84	Carcinome (métastase)	mut	mut	mut	Hyper-diploïdie		+
LS-174T	Duke's B	wt	wt	mut	Proche diploïdie	+	

Mut, génotype présentant des mutations ou pertes d'hétérozygoties par délétions alléliques (LOH) ; wt, allèles présentant un génotype sauvage ; n, nombre de chromosomes ; MIN, instabilité microsatellitaire ; instabilité chromosomique.

lame basale de l'épithélium intestinal contient les composants majeurs retrouvés pour les autres organes, à savoir un réseau de laminines (LM) et un réseau de collagène (CO) de type IV qui sont reliés ensemble par des molécules de nidogène et de perlecan (Beaulieu, 1997, 1999). Les différents constituants de la lame basale peuvent être mis en évidence par marquage immunologique avec des anticorps spécifiques. La spécificité tissulaire de la lame basale est liée à l'existence de divers isoformes (laminine ou collagène), du profil de glycosylation et de la combinaison des différentes molécules. Il est admis que les mêmes types de molécules organisés de façon différente et dans des proportions variables pourraient affecter des fonctions cellulaires spécifiques selon l'état physiopathologique des tissus. Les laminines sont les composants majeurs de la lame basale, ce sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées de l'association spécifique d'une chaîne α, β et γ (Miner et Yurchenco, 2004) Chez les mammifères, 15 trimères différents peuvent être formés à partir de gènes codant pour cinq sous-unités 5α, 3β et 3γ (Hamill et al., 2009 ; Durbeej, 2010). Selon la nouvelle nomenclature, les laminines sont nommées en fonction des sous-unités qui les composent (Aumailley et al., 2005). Pour déterminer l'origine cellulaire de la lame basale une stratégie d'intestin « chimère » (association inter-espèces d'un endoderme et d'un mésenchyme) couplée à l'utilisation d'anticorps spécifiques de chacune des espèces a été utilisée (Simon-Assmann et al., 2009). Bien que la lame basale est sous l'épithélium, la sécrétion de ces composants est un événement séquentiel qui résulte de la collaboration entre les cellules épithéliales et les fibroblastes sous-jacents, suggérant que les interactions epithélio-mésenchymateuses sont cruciales pour la morphogénèse intestinale et la différenciation cellulaire (Kedinger et al., 1986 ; Simon-Assmann et Kedinger, 2000 ; Simon-Assmann et al., 2010). *In vivo*, la distribution des isoformes de la laminine de la lame basale sous-épithéliale est spécifique selon le temps (développement/adulte), la région de l'intestin (duodénum/côlon) et la localisation crypte/villus. Les LM-111 et LM-211 sont restreintes aux cryptes alors que les LM-332 et LM-511 sont des marqueurs des villus (Teller et al., 2007 ; Miner, 2008) (**figure 27-7**). La distribution différentielle des laminines selon l'axe crypte-villus dans l'intestin adulte suggère que les laminines peuvent avoir des fonctions différentes et moduler des voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Les laminines jouent un rôle majeur lors du développement embryonnaire et l'organogenèse puisqu'elles sont capables de réguler la polarité cellulaire, l'adhésion, l'étalement et la migration (Hamill et al., 2009 ; Yurchenco et Patton, 2009 ; Durbeej, 2010). Ces effets passent par

Culture des cellules animales.indd 17 09/06/14 14:55

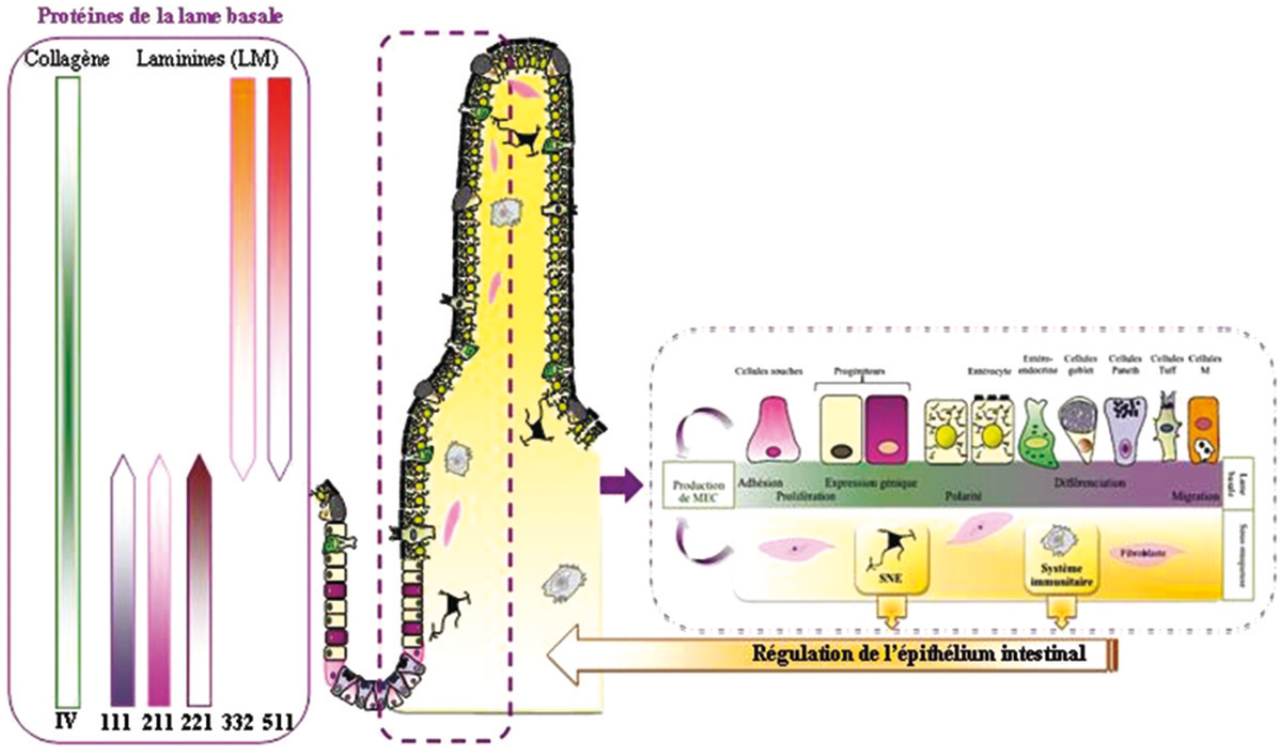


Figure 27-7 Distribution des laminines le long de l'axe crypte-villus : importance dans la morphogénèse intestinale et la différenciation cellulaire. Les protéines de la MEC sont distribuées de façon différentielle le long de l'axe crypte-villus d'un intestin grêle adulte : les LM-111 et LM-211 sont restreintes aux cryptes alors que les LM-332 et LM-511 sont exprimées au niveau des villus. Le collagène de type IV est exprimé uniformément le long de l'axe cryte-villus (Virtanen et al., 2000 ; Teller et Beaulieu, 2001). Ces protéines de la lame basale sont sécrétées de façon séquentielle par l'endoderme, le mésenchyme ou les deux (Simon-Assmann et al., 2010). Les protéines de la lame basale jouent un rôle majeur dans l'organogénèse et le développement embryonnaire. Elles sont capables de réguler différents processus tels que la prolifération, la polarité, la différenciation cellulaire et la migration. La morphogénèse et la fonction de l'épithélium intestinal sont aussi sous le contrôle des systèmes nerveux entérique (SNE) et immunitaire.

l'activation de différents récepteurs, tels que les intégrines (Ridley et al., 2003 ; Gilcrease, 2007), les protéoglycanes ou d'autres glycoprotéines liés à la membrane (dystroglycane ou luthéran). L'activation des intégrines est à l'origine de différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire (Shattil et al., 2010). Comme pour les laminines, il existe une distribution différentielle des intégrines le long de l'axe crypte-villus (Dydensborg et al., 2009a).

Mode opératoire

Co-culture de cellules épithéliales et mésenchymateuses

Compte tenu de l'origine endodermique des cellules épithéliales, de nombreux travaux ont porté sur les conditions de culture permettant la différenciation *in vitro* des cellules embryonnaires endodermiques, en particulier ceux menés par le groupe de M. Kedinger. L'endoderme est séparé du mésenchyme par un traitement à la collagénase et mis en culture dans le but de définir les conditions d'induction et de maintien de la différenciation entérocytaire (**figure 27-8**). Si les explants endodermiques sont cultivés sur plastique ; les cellules sont faiblement polarisées et meurent rapidement, indiquant que l'endoderme n'est pas capable d'autodifférenciation. En revanche, la culture des explants sur une membrane basale reconstituée (laminines + collagène de type I) induit la polarité des cellules épithéliales avec la présence de microvillosités apicales et l'expression d'enzymes digestives (lactases) (Kedinger et al., 1998a). Cependant, la durée de vie de ces cultures primaires est également très limitée. Un meilleur taux de survie et une différenciation plus poussée sont observés lorsque les explants endodermiques sont cultivés sur une monocouche cellulaire constituée de fibroblastes vivants et de cellules mésenchymateuses. Ces co-cultures sont viables plus de 2 à 3 semaines. Après le dépôt d'une structure semblable à une membrane basale à l'interface entre les cellules endodermiques et fibroblastiques (marquage de la laminine), la différenciation des cellules endodermiques est caractérisée par la présence de villosités et l'expression apicale de lactase ou de sucrase lorsque des glucocorticoïdes sont ajoutés à la co-culture (Kedinger et al., 1988 ; Simo et al., 1992). Les glucocorticoïdes

Culture des cellules animales.indd 18 09/06/14 14:55

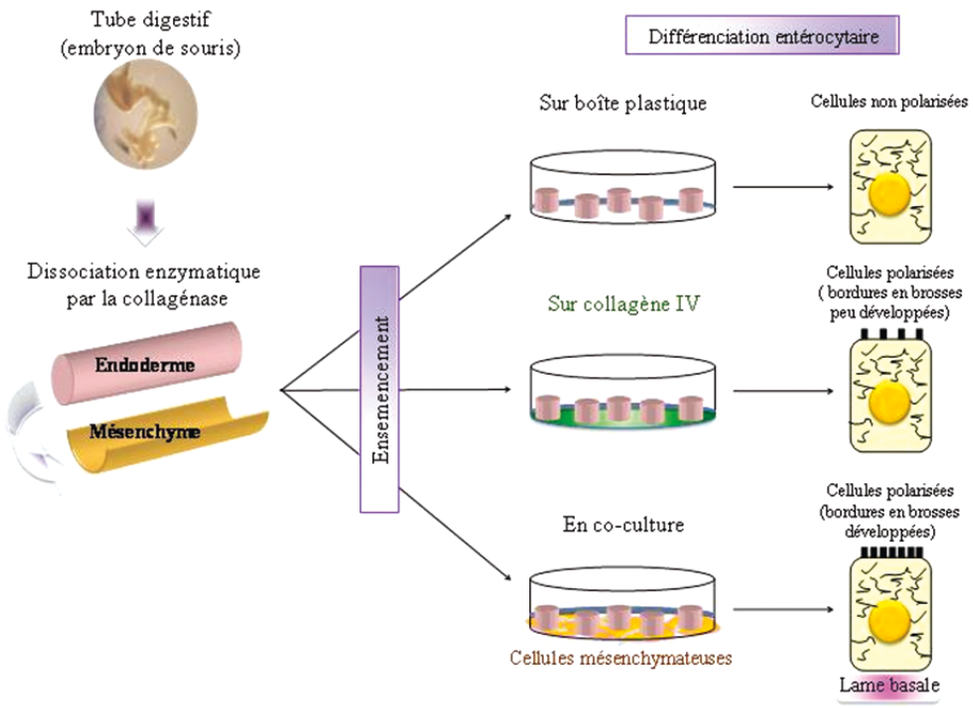


Figure 27-8 **Différenciation morphologique et fonctionnelle de l'endoderme intestinal.** Les cellules de l'endoderme intestinal (en rose) sont dissociées du mésenchyme (en ocre) par un traitement enzymatique à la collagènase. *En haut* : les cellules endodermiques sont ensemencées sur plastique, ce qui conduit à une faible polarisation des cellules et une absence de bordures en brosses. *Au milieu* : sur une matrice de collagène IV, les cellules endodermiques sont polarisées et présentent des bordures en brosses peu développées. *En bas* : la différenciation est plus poussée et la survie plus importante lors de co-cultures d'explants endodermiques sur une monocouche de cellules mésenchymateuses ou fibroblastiques (Simon-assmann et al., 2007).

ou l'acide rétinoïque (aussi utilisé pour induire la différenciation cellulaire) favorisent le dépôt de LM-111 à l'interface des cellules épithéliales et mésenchymateuses et stimulent la polarisation et la différenciation des cellules épithéliales. Ces résultats suggèrent que les contacts cellules-cellules sont nécessaires à la différenciation des cellules intestinales ainsi que la néosynthèse de nouvelles molécules de la MEC. Le lien entre le dépôt de laminines et la différenciation intestinale a été démontré par l'inhibition de l'expression de lactase dans les bordures en brosse de cellules endodermiques lors d'expériences de co-culture réalisées en présence de dexaméthasome et d'anticorps anti-laminine (Kedinger et al., 1987b ; Simo et al., 1992 ; Plateroti et al., 1997).

Cette approche permet également d'étudier les mécanismes mis en œuvre lors de la restitution intestinale, processus de réparation de l'épithélium endommagé (Iizuka et Konno, 2011). Ce processus est habituellement étudié lors de test de blessure-cicatrisation. Récemment, Beaulieu et al. ont développé un modèle de co-culture utilisant des cellules Caco-2 déposées sur des myofibroblastes intestinaux humains (lignée cellulaire HIM) (Seltana et al., 2010) comme test de blessure-cicatrisation. Des lésions sont générées dans la couche épithéliale sans affecter la couche de cellules mésenchymateuses. La restitution de la zone lésée est accélérée dans ces expériences de co-cultures comparées à des cellules Caco-2/15 seules. De plus, cette restitution est associée à une forte augmentation dans l'expression et le dépôt de protéines de la MEC telles que les LM-332 et LM-511, le collagène de type IV à la base des cellules migrantes, suggérant un rôle de ces protéines dans le processus de restitution.

Co-culture avec des cellules stromales

Les myofibroblastes intestinaux humains HIM sont isolés à partir de jéjunum de fœtus de 16 à 18 semaines (Francoeur et al., 2009). Ils sont ensuite cultivés en DMEM 20 mM HEPES/10 mM Glutamax®/4 % SVF. Ces cellules sont utilisées entre les passages 5 et 12. Pour établir des co-cultures, les cellules HIM sont cultivées en boîte P100 mm jusqu'à obtenir un tapis confluent. Le milieu de culture est ensuite adapté à celui des cellules Caco-2/15 en passant la concentration de SVF de 4 à 10 % pendant 1 semaine. Par la suite, 10^7 cellules Caco-2/15 sont ensemencées sur les cultures de HIM et maintenues 14 à 20 jours après l'obtention d'un tapis confluent.

Préparation des cellules mésenchymateuses

• ***Milieu de culture des cellules mésenchymateuses***

Milieu DMEM (4,5 g/l glucose), supplémenté avec 10 % de SVF (préalablement décomplémenté 30 minutes à

Culture des cellules animales.indd 19 09/06/14 14:55

56 °C), EGF (20 ng . ml^{-1}), insuline (0,25 UI . ml^{-1}), transferrine (10 µg . ml^{-1}) et un mélange de pénicilline/streptomycine aux concentrations finales respectives de 100 UI . ml^{-1} et 60 µg . ml^{-1}.

• ***Préparation de cellules mésenchymateuses***

Pour la préparation de cellules mésenchymateuses, l'iléon est coupé en segments de 2 à 3 mm et rincé vigoureusement dans du tampon Hank stérile (HBSS, faible calcium). Ces fragments sont émincés et incubés dans 300 U . ml^{-1} de collagénase *Clostridium histoliticum* type XI en présence de dispase 0,1 mg . ml^{-1} pendant 25 minutes à température ambiante. Les cellules mésenchymateuses sont isolées par pipetage des cellules épithéliales. La population cellulaire est enrichie en fibroblastes en centrifugeant la suspension à 16 g pendant 2 minutes Les cellules épithéliales sont éliminées dans le culot, le surnagent est centrifugé à 110 g pendant 5 minutes et resuspendu dans du milieu contenant 2 % de sorbitol. Cette procédure est répétée 5 fois. Le culot est repris dans du milieu de culture standard. La qualité de la préparation peut être estimée par la présence de marqueurs spécifiques des cellules du mésenchymateuses comme la vimentine et plus ou moins de marqueurs musculaires comme la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse ou l'α-actine de muscle lisse, détectables par des anticorps spécifiques (Fritsch et al., 1997).

Préparation de MEC native

L'une des MEC les plus utilisée est le Matrigel™ provenant de la membrane basale du sarcome Engelbreth-Holm-Swarm. Le Matrigel™ est conservé à –20 °C et doit être mis à 4 °C après sa décongélation, son passage à température ambiante entraînant sa polymérisation. Le Matrigel™ est homogénéisé en pipettant doucement avec des pipettes froides, puis 100 µl/puits (plaque 96 puits) sont déposés et incubés à 37 °C pendant 10 minutes.

Des matrices secrétées et déposées sur des supports plastiques par différents types cellulaires ont été utilisées pour augmenter la différenciation des cellules ou étudier la prolifération (**tableau 27-V**). Après le temps de culture nécessaire au dépôt maximum de constituants de la MEC, les cellules sont incubées en présence de PBS contenant 0,5 % de triton X-100 pendant 30 minutes à 37 °C, puis incubées dans une solution de NH_4OH 20 mM, 10 minutes à température ambiante. Enfin, les préparations sont rincées trois fois avec une solution 20 mM Tris-HCl, 0,15 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, puis exposées 30 minutes aux UV bactéricides à 254 nm (Le Beyec et al., 1997).

Culture des cellules épithéliales sur une MEC native

Pour étudier l'effet des interactions cellules-MEC sur l'adhérence intercellulaire, la régulation génique, la polarisation, la différenciation cellulaire ou la migration,

Tableau 27-V **Production de MEC native par différentes lignées cellulaire** (Fabricant et al., 1977 ; Panneerselvam et al., 1985 ; Kikkawa et al., 1998 ; Orian-Rousseau et al., 1998)

Cellules utilisées	Traitement	Nature de la MEC
L129C3B Lignée musculaire murine	Différenciées en myotubes (Pinçon-Raymond et al., 1991)	Laminine 211 (chaîne a2)
Caco-2 Adénocarcinome colique humain	Cultivées sur tapis de fibroblastes Bouziges et al., 1991)	Lamine 332
HT-29 Adénocarcinome colique humain	Adaptées au méthotrexate (Lesuffleur et al., 1990 ; Orian-Rousseau et al., 1998)	Laminine 332
A431 Carcinome épidermoïde squameux humain (Fabricant et al., 1977)	Stimulation par : – acide lysophosphatidique (LPA) (Yamashita et al., 2010) – *Epidermal Growth Factor* (EGF) – 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Panneerselvam et al., 1985)	Laminine 332 Laminine 332 Protocollagène IV
A459 Carcinome pulmonaire humain (Boccaccio et al., 1994)	(Kikkawa et al., 1998)	Laminine 511 Laminine 521 (chaîne a5)
C9, C11 et C20 Lignées mésenchymateuses dérivées de muqueuses de duodénum humain (Fritsch et al., 1999)		MEC diverses

Culture des cellules animales.indd 20 09/06/14 14:55

des cultures de cellules épithéliales (primaires, adénocarcinomes coliques…) ont été réalisées sur des MEC natives dérivées de cellules épithéliales ou mésenchymateuses (**figure 27-9**). Le niveau de différenciation varie selon l'origine de la MEC, la LM-332 (déposée par les cellules HT-29 traitées au MTX) conduit à une meilleure différenciation des cellules Caco-2 (estimée par l'expression des gènes I-FAB et apolipoprotéines) (Le Beyec et al., 1997). De même, l'activité sucrase est beaucoup plus importante dans des cellules cultivées sur LM-111 par rapport à une culture sur collagène de type I ou du plastique (Basson et al., 1996). Plusieurs protéines de la MEC (LM-221, LM-332 et CO IV) sont capables d'adresser la E-cadhérine au niveau des contacts intercellulaires et de favoriser leur assemblage (Schreider et al., 2002 ; Chartier et al., 2006 ; Peignon et al., 2006). Ces processus dépendent de l'activation de l'intégrine β1. Ce type d'approche a également permis d'étudier les voies de signalisation mises en jeu lors de ces processus. Par exemple, nous avons montré que l'assemblage des jonctions adhérentes est dépendant de l'activation de la PI3K, laquelle active Rac1b (Chartier et al., 2006).

Cependant, une question se pose sur la spécificité de la réponse cellulaire en fonction de la nature du substrat de laminines. Le groupe de Kedinger a montré que la LM-111 stimule la différenciation cellulaire ; ainsi, l'activité sucrase est détectée dans des cellules cultivées 3 jours sur LM-111, mais absente dans des cultures sur LM-332 et LM-511. En parallèle une forte immunoréactivité nucléaire pour cdx2 est observée, Cdx2 étant un facteur de transcription qui active la transcription de gènes codant pour des marqueurs de différenciation intestinale (sucrase) (Lorentz et al., 1997). La LM-111 serait donc la seule laminine qui accélère la différenciation des cellules Caco-2 durant les stades précoces de culture avant que les cellules déposent leurs propres matrices (Turck et al., 2005). Ces résultats ont été renforcés par une étude protéomique permettant d'étudier les différences d'expression nucléaire des cellules Caco-2/Tc7 cultivées ou non sur LM-111. La stratégie employée

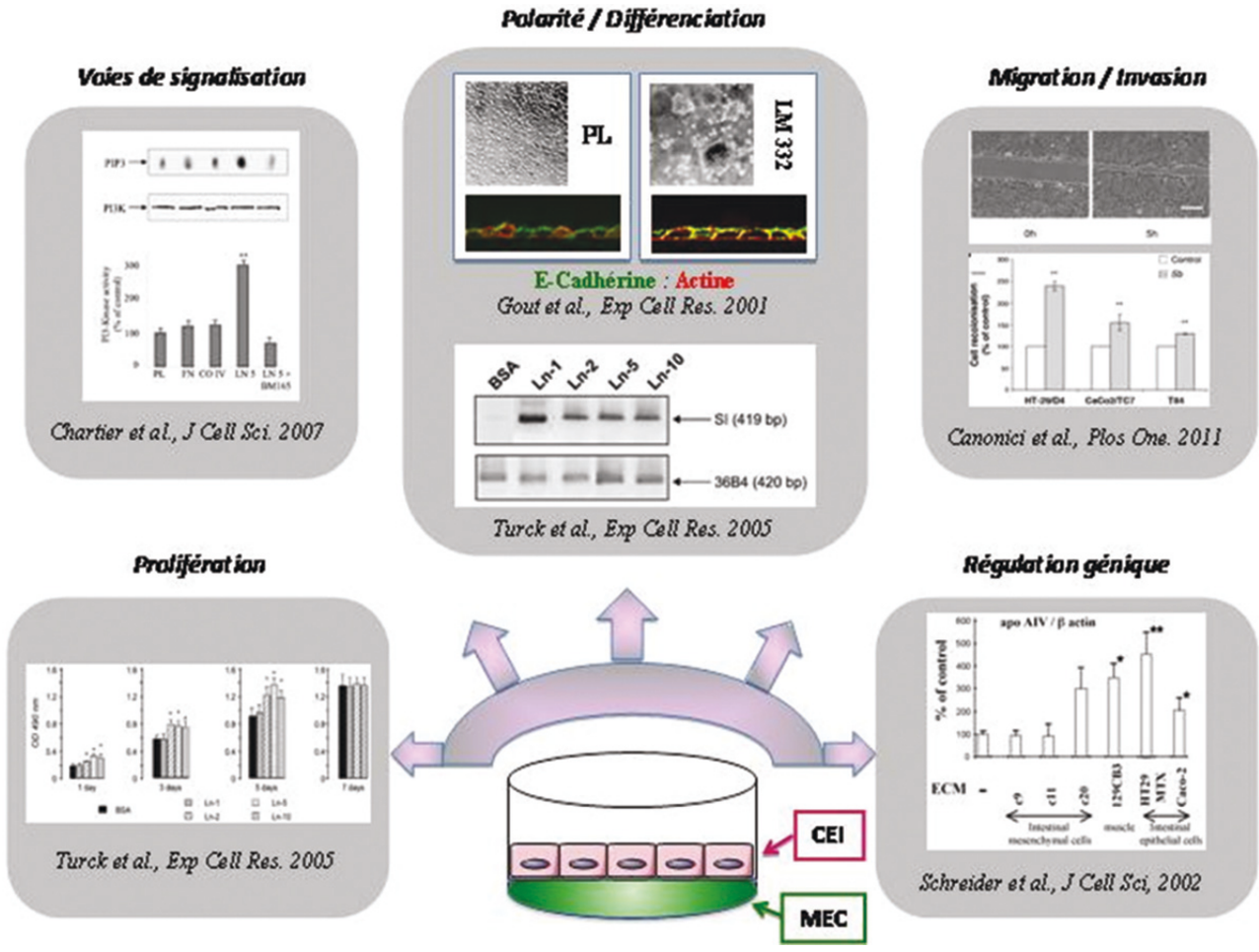


Figure 27-9 Illustration des différentes analyses fonctionnelles réalisées avec des cellules épithéliales intestinales en culture sur de la MEC. Les protéines de la MEC régulent de façon différentielle selon leur nature plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'expression génique, la prolifération, la polarité, la différenciation cellulaire, la migration ou l'invasion. CEI : cellules épithéliales intestinales. (D'après Schreider et al., 2002 ; Gout et al., 2004 ; Turck et al., 2005 ; Canonici et al., 2011)

Culture des cellules animales.indd 21 09/06/14 14:55

est basée sur l'électrophorèse 2D à haute résolution, suivie par l'identification des spots différemment exprimés par spectrophotométrie de masse et validation des données par immunodétection, ou par des analyses de RT-PCR des molécules potentiellement intéressantes. Une première étude comparative sur les protéines nucléaires provenant de cellules Caco-2/TC7 prolifératives ou différenciées a permis de détecter 400 spots parmi lesquels 85 spots correspondant à 60 protéines différentes ont été identifiés (Turck et al., 2004). Parmi ces protéines nucléaires, la nucléoline présente un intérêt particulier puisqu'elle est exprimée au stade prolifératif et disparaît au cours de la différenciation. Elle va se relocaliser au niveau de la membrane cellulaire dans les cellules différenciées. La présence de LM-111 ou l'utilisation de RNA interférence contre la nucléoline entraînent une perte d'expression nucléaire de la protéine associée à la polarisation et la différenciation des cellules Caco-2/TC7. Ces effets dépendent de l'activation de l'intégrine β1 et de la voie de signalisation impliquant les p38MAPK (Turck et al., 2006). Les modifications d'expression des protéines de la MEC au cours de la différenciation épithéliale sont associées à une modification de l'expression et/ou l'activation des intégrines, en particulier celles impliquées dans la reconnaissance des laminines, comme α3β1 ou α6β4 (Gout et al., 2001 ; Dydensborg et al., 2009b).

Les différents tests permettant d'évaluer les effets de la MEC

Ces tests évaluent les effets de la MEC sur les fonctions de transport et perméabilité de l'épithélium, la restitution, l'agrégation cellulaire, la migration et invasion cellulaire.

• Test de perméabilité épithéliale

Ces tests de perméabilité comprennent trois phases : la culture des cellules, l'expérience de transport, et l'analyse des résultats. Lors de la phase de culture cellulaire, les cellules sont cultivées dans une chambre de culture sur une membrane microporeuse (pore de 0,4 µm en général) où elles vont former une monocouche de cellules qui vont se différencier à partir de l'état de confluence. Le support (composition, diamètre, taille des pores) sur lequel la monocouche cellulaire se forme va influencer la prolifération et la différenciation des cellules (Delie et Rubas, 1997). La présence de MEC (collagène) accélère ces processus et affecte le transport des molécules. L'étanchéité de la monocouche de cellule est ensuite évaluée par le transport de molécules marquées (FITC-Dextran 4 kDa en DMEM sans rouge phénol, mannitol tritié, peroxydase…) ou la résistance électrique trans-épithéliale (voltohmètre). La molécule « traceur » est déposée au niveau de la surface apicale. Après incubation à 37 °C, l'analyse différentielle des contenus des deux compartiments permet de déterminer l'efficacité de transport du composé du pôle apical vers le pôle basal ainsi que sa vitesse. On peut distinguer deux types de transport : paracellulaire ou trans-cellulaire (entre les cellules).

Plusieurs paramètres peuvent influencer ces tests de perméabilité, tels que la densité cellulaire d'ensemencement, le nombre de passage des cellules, la confluence et le stade de différenciation, le support et les conditions de culture et des facteurs physicochimiques (T°c, agitation, solubilité et concentration du produit). Tous ces paramètres sont discutés dans une excellente revue (Volpe, 2008).

• Test de blessure/cicatrisation

Des tests de blessure/cicatrisation peuvent être effectués sur un tapis confluent de cellules. Une fine bande de cellules est retirée par aspiration avec un cône de 0,5 mm de diamètre (100 µl) de façon à mimer une blessure. Pour s'assurer d'une profondeur moyenne de la blessure, il est important de positionner le cône de la pipette de façon à former un angle de 30°. Les cellules sont ensuite incubées durant 24 heures dans du milieu sans sérum supplémenté avec 0,1 % d'albumine de sérum bovin. La surface lésée est mesurée à intervalles de temps régulier pour évaluer la restitution épithéliale intestinale. Il est possible de faire une vidéo de la restitution ou de compter les noyaux cellulaires observés entre les bordures de la blessure. Pour des temps longs (48 heures et plus), le milieu de culture peut être complémenté avec 2 mM d'hydroxyurée pour bloquer le cycle cellulaire et s'affranchir de la prolifération des cellules épithéliales. Ces tests de cicatrisation peuvent également être utilisés dans le cadre de co-culture, comme cela a été décrit par Seltana et al. (2010). *In vivo*, plusieurs facteurs influencent l'homéostasie intestinale. Ces facteurs ont été analysés lors des tests de blessure/cicatrisation et leurs mécanismes d'action ont pu être clarifiés (Iizuka et Konno, 2011).

• Test de migration et d'invasion cellulaires

Plusieurs types de test ont été mis au point pour évaluer l'invasion cellulaire. Une étude comparative de ces tests portant sur différentes lignées de carcinomes coliques a été réalisée par de Both et al. (1999). Il existe des tests effectués *in vitro* comme l'invasion en Matrigel™ ou sur collagène, l'invasion sur une couche confluente de fibroblastes ou l'invasion de cœur de poulet (qui se rapproche des conditions physiologiques). L'invasion peut également être testée *in vivo* par transplantation ectopique (sous-cutané) ou orthopique (cavité abdominale) de souris femelles *nude*. Les protocoles expérimentaux correspondant à ces différents tests sont décrits en détail dans plusieurs articles (Bracke et al., 2001a ; Bracke et al., 2001b).

Des tests de transmigration sont réalisés dans des inserts constitués d'une membrane microporeuse de 8 µm de diamètre en plaque de 24 puits. Les inserts sont réhydratés pendant 2 heures à 37 °C avec 500 µl de milieu sans SVF dans les chambres supérieures et inférieures. Lors du test, 150 µl de milieu est retiré de la chambre supérieure et remplacé par 150 µl d'une solution de DMEM sans SVF contenant $1,5 \times 10^5$ cellules. Le milieu de la chambre inférieure est remplacé par du milieu de culture contenant 10 % de SVF afin d'établir un gradient (qui attire les cellules en direction de la chambre inférieure). Les cellules sont ainsi incubées de 6 à 48 heures avant l'analyse de la transmigration. Le

Culture des cellules animales.indd 22 09/06/14 14:55

milieu de la chambre supérieure est aspiré et la surface de la membrane est délicatement nettoyée à l'aide d'un cotontige (pour retirer les cellules n'ayant pas migré), puis lavée deux fois en PBS. Les inserts sont ensuite transférés dans de nouveaux puits contenant 500 µl de PBS. Les cellules ayant migré se retrouvent sur la face inférieure des inserts de culture ; elles sont fixées 10 minutes dans 500 µl de méthanol à –20 °C. Le marquage des noyaux est effectué au DAPI ou à l'hématoxyline, puis les membranes des inserts sont découpées et montées sur lame pour des comptages cellulaires en microscopie.

Applications

Ces expériences de co-culture ont apporté de nombreuses informations sur le potentiel inducteur du mésenchyme ou de l'endoderme, sur l'expression des enzymes de la bordure en brosse et la capacité de l'endoderme (provenant du côlon) à donner de l'intestin sous l'influence de mésenchyme (provenant de l'intestin grêle) (Kedinger et al., 1981 ; Haffen et al., 1982 ; Kedinger et al., 1986 ; Duluc et al., 1994), mais aussi sur le rôle du facteur de transcription caudal Cdx, qui est un régulateur incontournable de l'identité intestinale comme cela a été mis en évidence dans des expériences de déplétion génétique (Knock Out) (Beck et Stringer, 2010) (Duluc et al., 1997 ; Gao et al., 2009). Toutefois, ces approches peuvent être étendues à d'autres voies de signalisation et de facteurs de transcription.

Ces expériences qui ont été initialement réalisées avec des cellules progénitrices ou épithéliales pourraient être étendues aux cellules $Lgr5^+$ et ainsi fournir des réponses sur le rôle de la lame basale dans le maintien et le devenir des cellules souches. Elles pourraient également répondre à un certain nombre de questions, notamment sur le rôle de la lame basale dans la niche des cellules souches intestinales, les voies de signalisation émanant de la lame basale vers les cellules souches, la capacité des cellules souches à sécréter de la MEC, et la nature des changements majeurs dans le micro-environnement des cellules souches du côlon qui pourraient faciliter l'émergence des tumeurs.

Ces approches présentent aussi un intérêt dans l'étude des processus d'initiation de situations pathologiques. En effet, l'expression des laminines est dérégulée dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Spenle et al., 2012). Des changements de structures de la lame basale ont été observés dans les tissus coliques de patients atteints de rectocolites hémorragiques (perte d'expression des laminines et augmentation de l'expression des collagène de type IV et V) (Schmehl et al., 2000). De même, une dérégulation de l'expression des laminines est décrite au niveau de l'intestin grêle de patients atteints de la maladie de Crohn (déficience en LM-α2), et une augmentation de l'expression des LM-α3 et LM-α5 (Bouatrouss et al., 2000). Chez ces patients, des altérations des fibroblastes péricryptaux ont été observées, suggérant que des défauts de sécrétion de MEC pourraient être liés en partie à une dédifférenciation des myofibroblastes (Francoeur et al., 2009). Des expériences de co-culture devraient apporter des informations sur les voies de signalisation et les mécanismes mis en jeu dans ces processus.

Par le système nerveux entérique

Origine et constituants cellulaires

Le système nerveux entérique (SNE) est un système nerveux intégratif situé dans la paroi digestive, de l'œsophage au rectum. Il est organisé en deux plexus principaux composés de ganglions interconnectés par des fibres inter-ganglionnaires. Le plexus myentérique est situé entre la couche musculaire circulaire et la couche longitudinale alors que le plexus sous-muqueux se trouve immédiatement sous la muqueuse intestinale. Le nombre de plexus dépend des espèces, allant de deux chez le rat ou la souris jusqu'à neuf chez l'Homme (**figure 27-10**).

Le SNE contient 200 millions de neurones entériques et environ 400 à 800 millions de cellules gliales entériques ; ces dernières présentent des propriétés morphologiques et phénotypiques proches des astrocytes du système nerveux central. L'ensemble des cellules du SNE dérive des cellules de la crête neurale. Les cellules de la crête neurale se détachent de la plaque neurale et colonisent l'ensemble du tube digestif dans le sens rostro-caudal durant l'embryogénèse. La partie distale du tube digestif est, en revanche, colonisée dans le sens caudo-rostral par les cellules de la crête neurale sacrées. Cette colonisation a lieu précocement durant la vie fœtale (E14 chez la souris et E15 chez le rat). Toutefois, la maturation du SNE se poursuit de manière importante, mais encore mal caractérisée durant la période post-natale. De plus, des processus dégénératifs caractérisés par une perte neuronale et/ou gliale sont observés dans le SNE au cours du vieillissement ou de pathologies digestives.

Fonctions neuronales et gliales entériques

Le rôle central joué par le SNE dans la régulation des fonctions digestives est maintenant clairement reconnu. Les études se sont principalement concentrées sur la

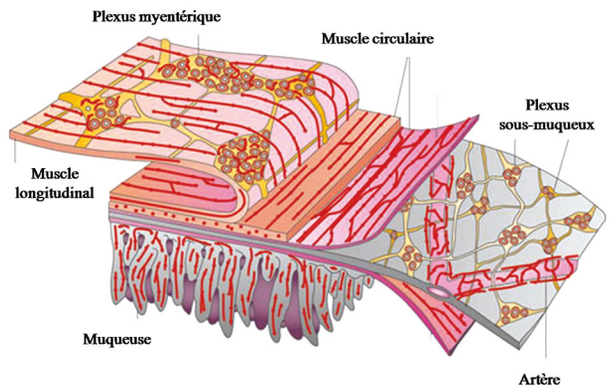


Figure 27-10 Organisation du système nerveux entérique. (D'après Furness, 2012)

Culture des cellules animales.indd 23 09/06/14 14:55

motricité digestive et les processus de sécrétion hydroélectrolytique. En particulier, les circuits neuronaux entériques responsables du péristaltisme ont une polarisation et un phénotype spécifique (neurones excitateurs ascendants cholinergiques et neurones inhibiteurs descendants nitrergiques). De même, une polarisation des neurones innervant la muqueuse a été identifiée et leur activation régule la sécrétion d'électrolytes.

Des études plus récentes montrent que le SNE jouerait également un rôle clef dans le contrôle de la réponse immunitaire digestive et dans la régulation de fonctions de la barrière épithéliale intestinale comme la perméabilité, la réparation et la prolifération/différentiation. D'autre part, les fonctions et le phénotype du SNE sont aussi modulés par les constituants de son micro-environnement : les cellules épithéliales, immunitaires et musculaires ou le microbiote. Le développement de modèles de co-culture a joué un rôle important dans la mise en évidence et l'étude des interactions entre le SNE et son environnement.

L'étude du rôle des cellules gliales entériques dans le contrôle des fonctions neuronales et digestives est un domaine de recherche en plein essor, grâce en particulier au développement récent d'outils de culture cellulaire et de ciblage génétique. De plus, le rôle des cellules gliales entériques a, jusqu'à présent, été peu étudié car, contrairement aux neurones entériques, ce sont des cellules non excitables. Néanmoins en combinant des études *in vivo* d'ablation de cellules gliales entériques et *in vitro* de co-culture de cellules gliales entériques et cellules cibles (épithéliale, neuronale, endothéliale), les effets protecteurs/réparateurs des cellules gliales entériques sur la barrière épithéliale intestinale (Neunlist et al., 2007 ; Savidge et al., 2007a, 2007b ; Neunlist et al., 2008 ; Van Landeghem et al., 2009 ; Bach-Ngohou et al., 2010 ; Soret et al., 2010 ; Flamant et al., 2011 ; Van Landeghem et al., 2011) ou les effets neuroprotecteurs ont été clairement établis (Abdo et al., 2010, 2012 ; Moriez et al., 2009).

Modèles cellulaires d'étude

Cultures primaires de SNE et ciblage génétique

Les cultures de SNE représentent le plus souvent des systèmes pluricellulaires intégrés avec au moins les deux types cellulaires de base du SNE : les neurones entériques et les cellules gliales entériques. Ces cultures sont obtenues à partir d'intestins d'embryon de rat ou de souris.

• ***Cultures primaires de SNE à partir d'intestins d'embryons (rat, souris)***

La mise en place de la culture primaire est brièvement décrite dans la **figure 27-11**, et détaillée dans les articles de Chevalier et al. (2008) et Gomes et al. (2009). Les cellules prolifèrent et se différencient au cours de la culture primaire. Après adhésion, le nombre de cellules augmente

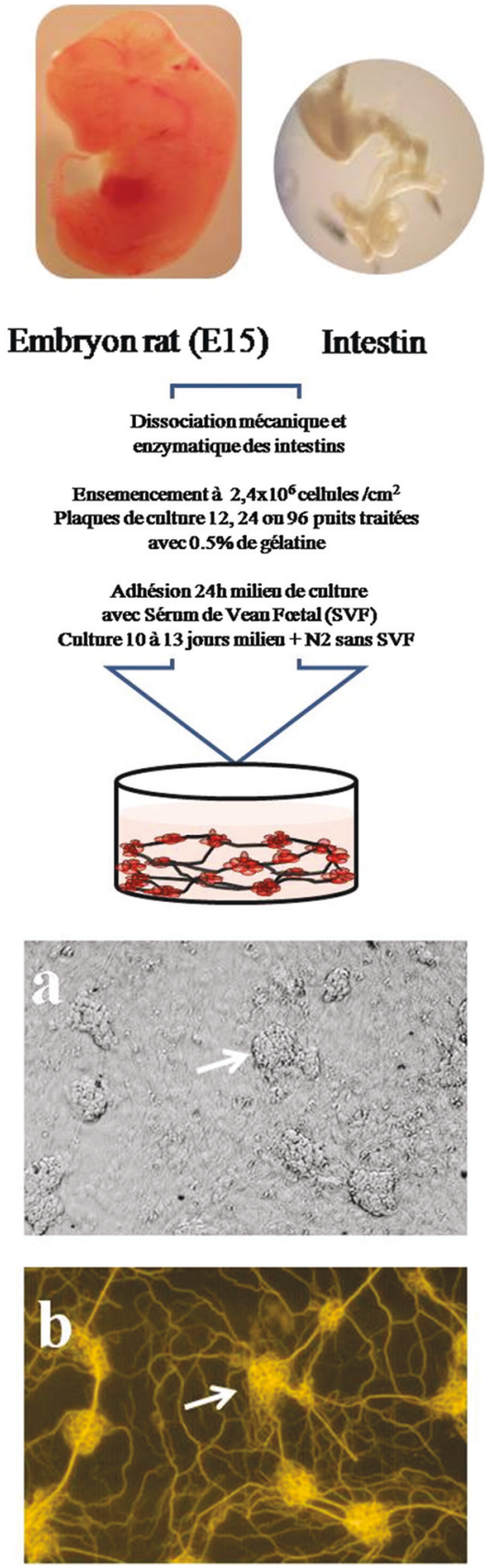


Figure 27-11 Culture primaire de système nerveux entérique. (A) Photo en lumière blanche. **(B)** Marquage immunologique des neurones entériques avec la β3 tubuline.

Culture des cellules animales.indd 24 09/06/14 14:55

progressivement et est multiplié par 5 après 10 à 13 jours de culture, formant un tapis cellulaire confluent avec des ganglions facilement identifiables composés de deux types cellulaires : les neurones entériques (marquage β3-tubuline ou Hu) représentant 5 à 6 % des cellules et les cellules gliales entériques (marquage S100b ou Sox10) composant au moins 20 % de la population cellulaire (**figure 27-12**).

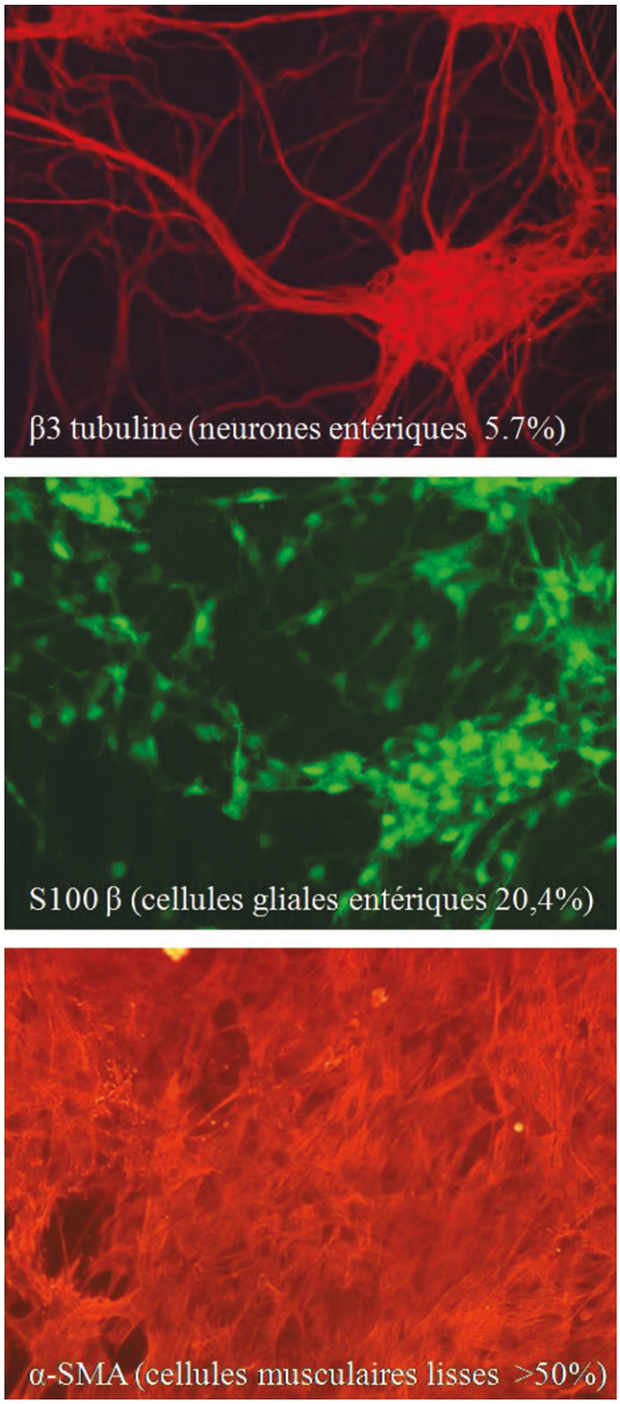


Figure 27-12 **Principales structures cellulaires identifiées dans les cultures primaires de SNE.**

Ce réseau neuro-glial se met en place sur un tapis cellulaire composé essentiellement de cellules musculaires lisses (marquage α-SMA). IL est caractérisé par une étroite association entre les neurones entériques et les cellules gliales entériques à la fois au niveau des ganglions et le long des fibres nerveuses (**figure 27-13**). D'autres marqueurs neuronaux (HuC/D, PGP9.5, NSE) et gliaux (GFAP, Sox10) ont été identifiés et utilisés pour caractériser les populations cellulaires présentes dans la culture primaire. Ce modèle de culture de SNE a été utilisé pour étudier les propriétés des neurones entériques (Chevalier et al., 2008 ; Gomes et al., 2009 ; Soret et al., 2010), les interactions neuro-gliales, en particulier les effets neuroprotecteurs des cellules gliales entériques (Abdo et al., 2010 ; Abdo et al., 2012) et les interactions SNE-cellules épithéliales (Moriez et al., 2009).

• ***Ciblage génétique du SNE en culture primaire***

La modification de l'expression des gènes neuronaux et/ou gliaux dans ce modèle de culture primaire pluricellulaire est importante pour analyser au niveau moléculaire les interactions cellulaires entre les cellules du SNE d'une part et entre le SNE et les cellules épithéliales d'autre part. L'objectif du ciblage génétique est à la fois d'obtenir la meilleure efficacité possible et de pouvoir cibler spécifiquement une population cellulaire précise. L'utilisation d'une vectorisation par les liposomes d'ARNsi a permis de réduire l'induction de l'expression de certains gènes ; toutefois, cette méthode présente une faible efficacité. En revanche, l'application d'une vectorisation virale est beaucoup plus efficace, avec une spécificité probablement différente en fonction des virus utilisés (Soret et al., 2010). Les adénovirus de type Ad5 avec un promoteur CMV permettent l'expression de protéines, comme la β-galactosidase, de manière préférentielle dans 80 % des cellules gliales entériques (**figure 27-14**) (Abdo et al., 2010), le nombre de particules virales utilisées étant 20 fois supérieur au nombre total de cellules. Des résultats similaires sont obtenus

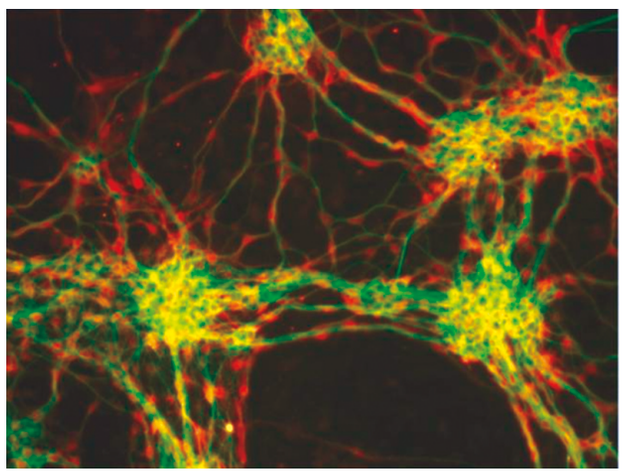


Figure 27-13 **Réseau neuro-glial** avec les neurones entériques (β3 tubuline en vert) et les CGE (S100β en orange).

Culture des cellules animales.indd 25 09/06/14 14:55

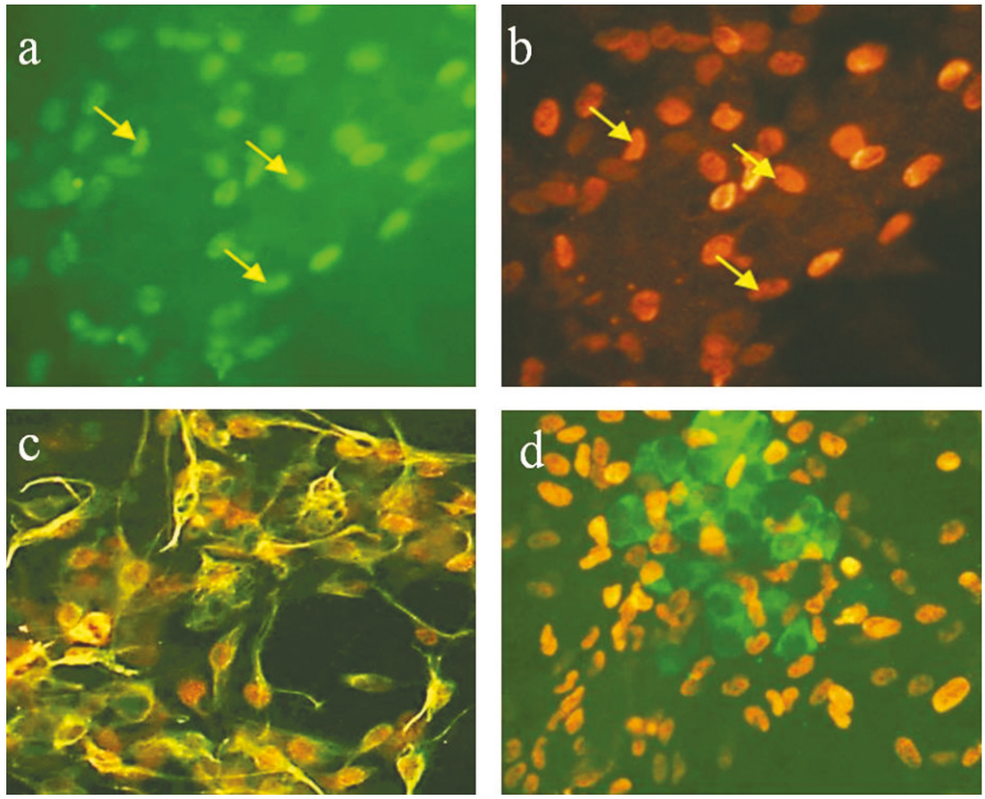


Figure 27-14 **Expression de la β-galactosidase** possédant un signal de localisation nucléaire (**B**) dans le noyau des cellules gliales entériques (**A**, Sox10) après infection par des adénovirus (Ad5-CMV-nlsLacZ). (**C**) Co-localisation β-galactosidase (orange) et GFAP (jaune). (**D**) Absence de co-localisation β-galactosidase (orange) et le marqueur neuronal Hu (vert).

après infection avec des adénovirus permettant l'expression d'une protéine fluorescente (GFP). Dans les deux cas, il n'y a pas d'expression détectable des protéines β-galactosidase et GFP dans les neurones entériques et les cellules musculaires lisses. De manière intéressante, les particules lentivirales ayant à leur surface la glycoprotéine G (virus de la somatite vésiculaire) possèdent une efficacité très élevée pour infecter les cellules du SNE (**figure 27-15**). Dans ces conditions, l'expression de la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (pgk) est observée dans plus de 60 % des cellules gliales entériques et plus de 90 % des neurones entériques. Ces résultats sont obtenus avec un nombre de particules virales moins important que pour les adénovirus (5 fois le

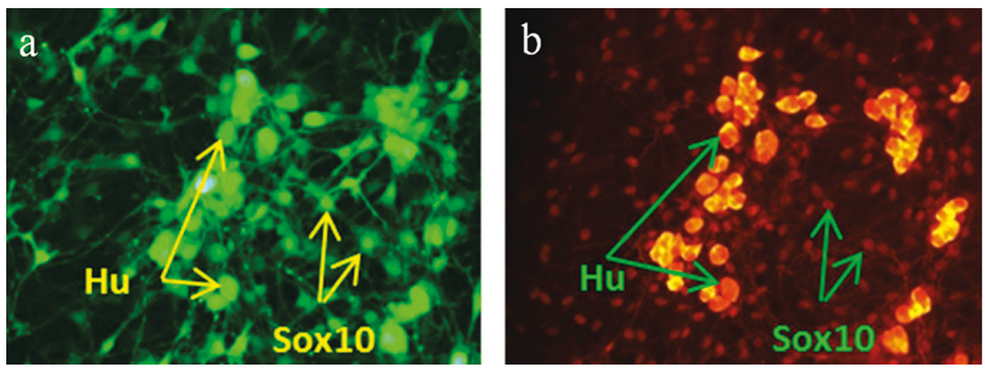


Figure 27-15 **Expression de la GFP (A)** dans les cellules du système nerveux entérique (**B**) (NE Hu et CGE Sox10) après infection par des lentivirus exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur pgk.

Culture des cellules animales.indd 26 09/06/14 14:55

nombre de cellules). L'expression de la GFP dans les cellules musculaires lisses est faible et seulement associée à un nombre très limité de cellules. L'utilisation de vecteurs lentiviraux ciblant l'expression de la GFP sous le contrôle d'un promoteur glio-spécifique (GFAP par exemple) ou neuro-spécifique (β3-tubuline par exemple) permet clairement d'avoir une expression beaucoup plus spécifique du transgène (**figure 27-16**). Cette vectorisation lentivirale peut aussi être envisagée en culture organo-typique *ex vivo* ou *in vivo* directement dans la paroi du tube digestif. L'expression de protéines d'intérêt peut être réalisée en remplaçant la GFP par l'ADNc correspondant dans le plasmide. La production de lentivirus non purifiés ou partiellement purifiés apparaît suffisante pour la plupart des expériences *in vitro*, production qui doit être faite dans des conditions autorisées respectant la législation en matière d'OGM.

Cultures de cellules gliales entériques et de neurones entériques

Le SNE de cobaye a été isolé et mis en culture pour la première fois par Jessen et al (1983). Cinq ans plus tard, Bannerman décrit comment isoler les neurones entériques des cellules gliales entériques (Bannerman et al., 1988). Depuis, différents protocoles ont été testés pour isoler et/ou cultiver les composants du SNE, tous basés sur une dissociation mécanique, puis chimique de l'intestin grêle ou du côlon combinée à un tri selon des critères morphologiques ou immuns. Jusqu'à présent, ces travaux concernaient majoritairement des tissus de rongeurs. Toutefois, il existe actuellement une méthode applicable à la souris, au rat et à l'Homme (Soret et al, en préparation).

• ***Les cellules gliales entériques***

Le **tableau 27-VI** résume l'évolution des méthodes de mise en culture des cellules gliales entériques. Elles sont toutes basées sur la purification de ganglions myentériques (**figure 27-17**) et combinent la survie des cellules gliales entériques et l'élimination des neurones entériques, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses contaminants. Jessen décrivit le premier la culture de cellules gliales entériques de cobaye (Jessen et al., 1983). La méthode a été améliorée et adaptée au rat et à la souris, mais est restée longtemps basée sur la destruction des cellules musculaires et fibroblastiques contaminantes par utilisation d'anti-mitotique et immunolyse (Eccleston et al., 1987 ; Bannerman et al., 1988 ; Bernstein et Vidrich, 1994 ; Ruhl et al., 2001). Une nouvelle évolution de la méthode est décrite en 2011, consistant en l'immunodéplétion des fibroblastes et cellules musculaires contaminants en utilisant un anticorps anti-Thy1.1 (Cirillo et al., 2011). La méthode la plus récente combine une simplification des procédures précédemment décrites avec une application possible à la souris, au rat et à l'Homme, et repose sur la sélection stricte par pipetage

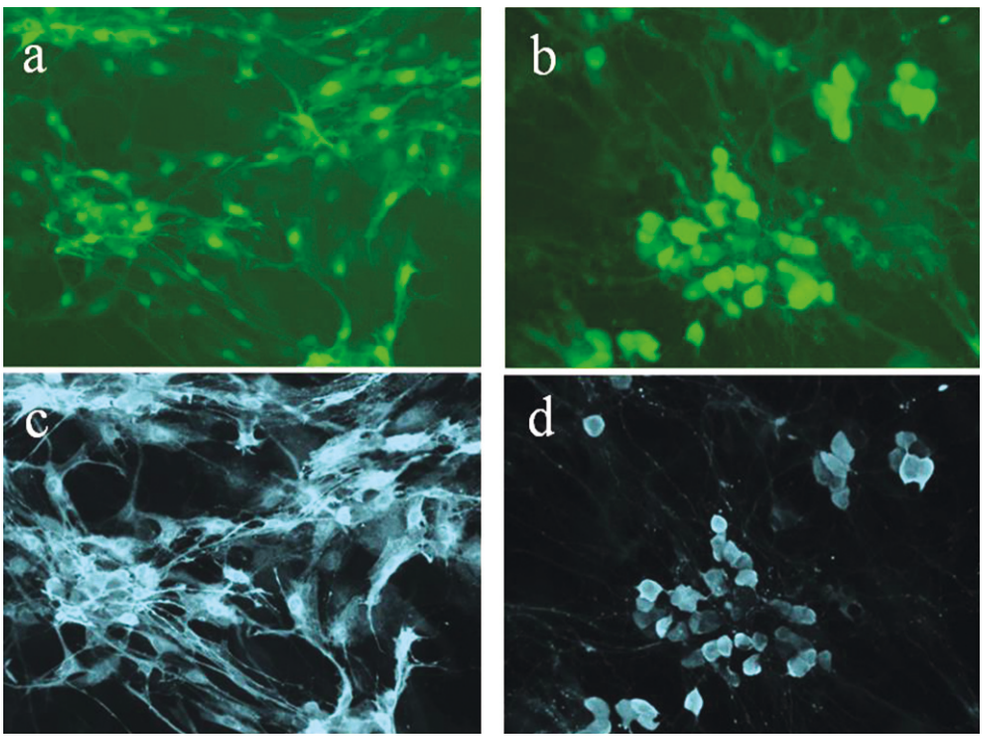


Figure 27-16 **Expression de la GFP dans les cellules du système nerveux entérique** après infection par des lentivirus exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP (**A, C**) ou de la β3 tubuline (**B, D).** (**A** et **B**) Photos en fluorescence directe. (**C** et **D**) Marquage immunologique avec un anticorps anti-GFP.

Culture des cellules animales.indd 27 09/06/14 14:55

Tableau 27-VI Évolution des méthodes de préparation de culture de cellules gliales entériques.

	Banneman et al., 1988		Ruhl et al., 2001		Soret et al. (en préparation)	
Matériel de départ	Fragments d'intestins de cobayes nouveau-nés		Fragments de 4 à 6 cm jéjunum entier de rat adulte		Fragments de 1 à 2 cm côlon ou iléon de souris ou rat adulte	Fragments de 5 à 9 cm^2 côlon ou iléon humain
Dissociation des tissus	Digestion : 1 mg ml^{-1} collagénase 16 H		Détubulisation et étirement du fragment pour isoler le plexus myentérique associé aux muscles longitudinaux (PMML)		Étirement sur pipette pour section et isolement de PMML	Détubulisation et étirement du fragment pour isoler le PMML
			Fragments de 5 mm Digestion : par la dispase 6 u ml^{-1} DMEM 37 °C, 30 à 60 min		Digestion : 250 mg ml^{-1} collagénase, 1 mg ml^{-1} protéase, 5 mg ml^{-1} BSA DMEM, 37 °C, 10 à 15 min	Fragments de 5 mm Digestion: 250 mg ml^{-1} collagénase, 1 mg ml^{-1} protéase, 5 mg ml^{-1} BSA DMEM, 37 °C, 45 min en rotation tubes GentleMACS
Élimination des contaminants	Dissection et isolement des ganglions pour enlever le muscle lisse				Isolement des ganglions pour enlever toute contamination neuro-gliale	
Première phase de culture	Mise en culture sur poly-L-lysine		Mise en culture sur plastique		Mise en culture sur gélatine 0,5 %	
	Milieu 199 10 % SVF 5 g l^{-1} glucose 100 UI ml^{-1} P 100 mg ml^{-1} S 5 mg ml^{-1} insuline 20 mM Ara-C	6 jours dans incubateur à 37 °C, 5 % CO_2, croissance cellulaire	DMEM 4,5 g l^{-1} glucose 10 % SVF 100 UI ml^{-1} P 100 mg ml^{-1} S 0,25 mg ml^{-1} A 10 mM Ara-C	14 jours dans incubateur à 37 °C, 5 % CO_2, croissance cellulaire	DMEM 4,5 g l^{-1} glucose 10 % SVF 100 UI ml^{-1} P 100 mg ml^{-1} S 0,25 mg ml^{-1} A 20 mg ml^{-1} G	2 jours dans incubateur à 37 °C, 5 % CO_2, croissance cellulaire Élimination des contaminations cellulaires restantes
Élimination des NE	Excision des centres neuronaux avec une seringue G21		DMEM 500 mg ml^{-1} BPE 1 mM FSK	3 à 4 semaines d'amplification, croissance de la glie périphérique	Pas de survie neuronale	
Élimination des fibroblastes résiduels	Anticorps anti-Thy-1.1 complément MEM-HEPES	45 à 60 min à 37 °C, lyse des fibroblastes résiduels	Anticorps anti-Thy-1.1 complément MEM-HEPES	30 min à 37 °C, lyse des fibroblastes résiduels	Moins de 5 % de cellules non immunoréactives pour GFAP, Sox10 et S100b à P1, et moins de 20 % à P3	
Deuxième phase de culture	Milieu 199 10 % SVF	6 jours dans incubateur à 37 °C, 5 % CO_2, amplification de la culture	DMEM 500 mg ml^{-1} BPE 1 mM FSK	1 à 2 semaines d'amplification, croissance de la glie périphérique	DMEM 4,5 g l^{-1} glucose 10 % SVF D	2 à 20 semaines d'amplification, jusqu'à 3 passages (P3)
			DMEM 10 % SVF	3 à 4 semaines d'amplification		

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ; SVF : sérum de vœu fœtal ; SVFΔ : sérum de vœu fœtal décomplémenté ; P, pénicilline ; S, streptomycine ; A, amphotéricine B ; G, gentamycine ; BPE, *Brain Pituitary Extract* ; Ara-C, cytosine-arabinoside (antimitotique pour éliminer les fibroblastes et les cellules musculaires restantes). (Bannerman et al., 1988 ; Ruhl et al., 2001)

Culture des cellules animales.indd 28 09/06/14 14:55

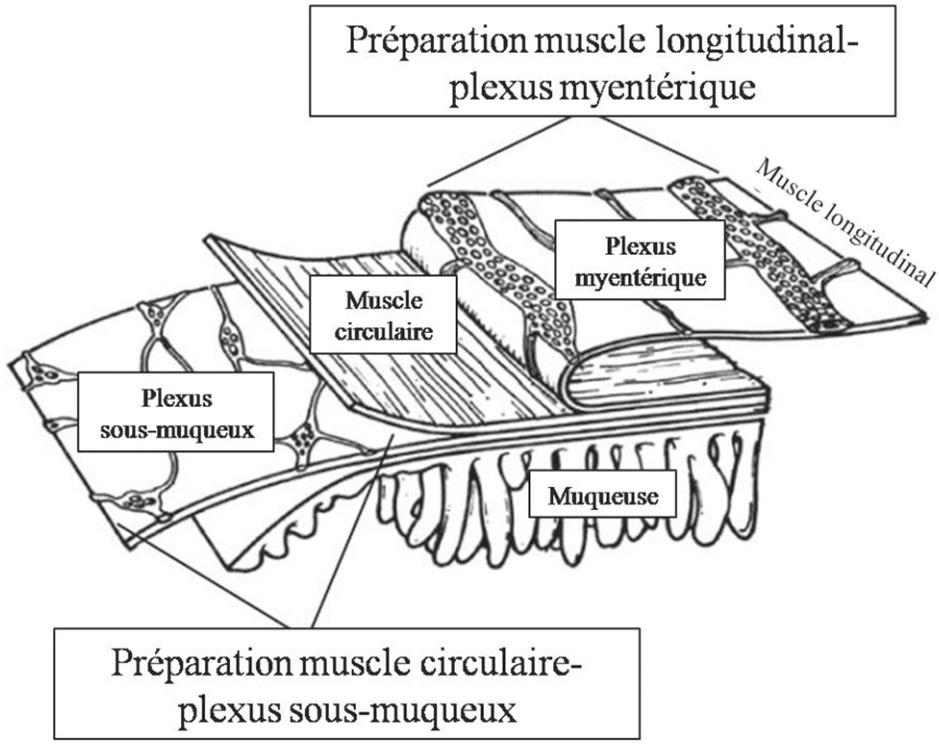


Figure 27-17 **Représentation des plexus myentérique et sous-muqueux du système nerveux entérique.** L'isolement du plexus myentérique associé au muscle longitudinal (PMML) est le point de départ des cultures de cellules gliales entériques.

sous microscope des ganglions et fibres interganglionnaires. Un minimum de cellules contaminantes est présent, les neurones entériques ne survivent pas alors que les cellules gliales entériques sont maintenues en cultures jusqu'à 5 mois (*voir* tableau 27-VI ; **figure 27-18**) (Soret et al, en préparation).

Pour une première approche plus simple, la lignée gliale entérique CRL-2690 (ATCC CRL-2690TM) créée à partir de jéjunum de rat est souvent utilisée (Ruhl et al., 2001).

• ***Les neurones entériques***

Il n'existe actuellement pas de culture de neurones entériques isolés. La première culture de neurone entériques a été faite à partir de la même préparation de plexus myentérique que pour les premières cultures de cellules gliales entériques, mais l'exposition à la cytosine arabinoside est prolongée et associée à une cytolyse induite par le complément pour supprimer les fibroblastes et les cellules gliales entériques. Les cellules gliales entériques survivantes sont éliminées par incubation avec les anticorps LB1 (anti-ganglioside GD3) (Bannerman et al., 1988 ; Eccleston et al., 1989). Le milieu de culture est ensuite enrichi avec 10 ng . ml^{-1} de NGF (*Nerve Growth Factor*). Des ganglions myentériques isolés à partir d'iléon de rat de 7 jours peuvent être dissociés et maintenus en culture seulement pendant 1 à 2 jours pour des études de survie neuronale (Korsak et al., 2012). La neurturine (NT-3) ou le GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*) augmentent non seulement la survie et la prolifération neuronales, mais aussi celles des cellules gliales entériques, limitant ainsi leur utilisation pour obtenir des cultures de neurones entériques purs (Heuckeroth et al., 1998). Finalement, la difficulté de ces méthodes et le nombre limité de cellules isolées font que la culture de neurones entériques purs est peu utilisée.

Toutefois, des études plus récentes de purification de neurones entériques à partir d'estomacs ou d'intestins d'embryons de rat (E14,5) ou de souris (E13,5) ont permis de séparer les cellules immunoréactives pour le récepteur au NGF (p75NTR). Elles peuvent être maintenues en culture jusqu'à 48 heures sur poly-D-lysine dans un milieu DMEM/F12 enrichi en sélénite de sodium (30 nmol . l^{-1}), putrescine dihydrochloride (100 µmol . l^{-1}), progestérone (20 nM), insuline (5 µg . ml^{-1}), transferrine (10 µg . ml^{-1}), fétuine (0,1 mg . ml^{-1}), albumine sérique de bœuf (1 mg . ml^{-1}) et GDNF (100 ng . ml^{-1}) (Anitha et al., 2006, 2008). De nouveaux milieux de culture « pro-neuronaux » sont en développement et pourraient être utiles pour une culture plus durable de neurones entériques isolés (Laranjeira et al., 2011).

Enfin, l'étude des neurones entériques *ex vivo* est aussi réalisée à partir de neurosphères, agglomérats de précurseurs neuronaux, de neurones et de cellules gliales entériques matures (Bondurand et al., 2003 ; Metzger et al., 2009 ; Schafer et al., 2003 ; Silva et al., 2008).

Culture des cellules animales.indd 29 09/06/14 14:55

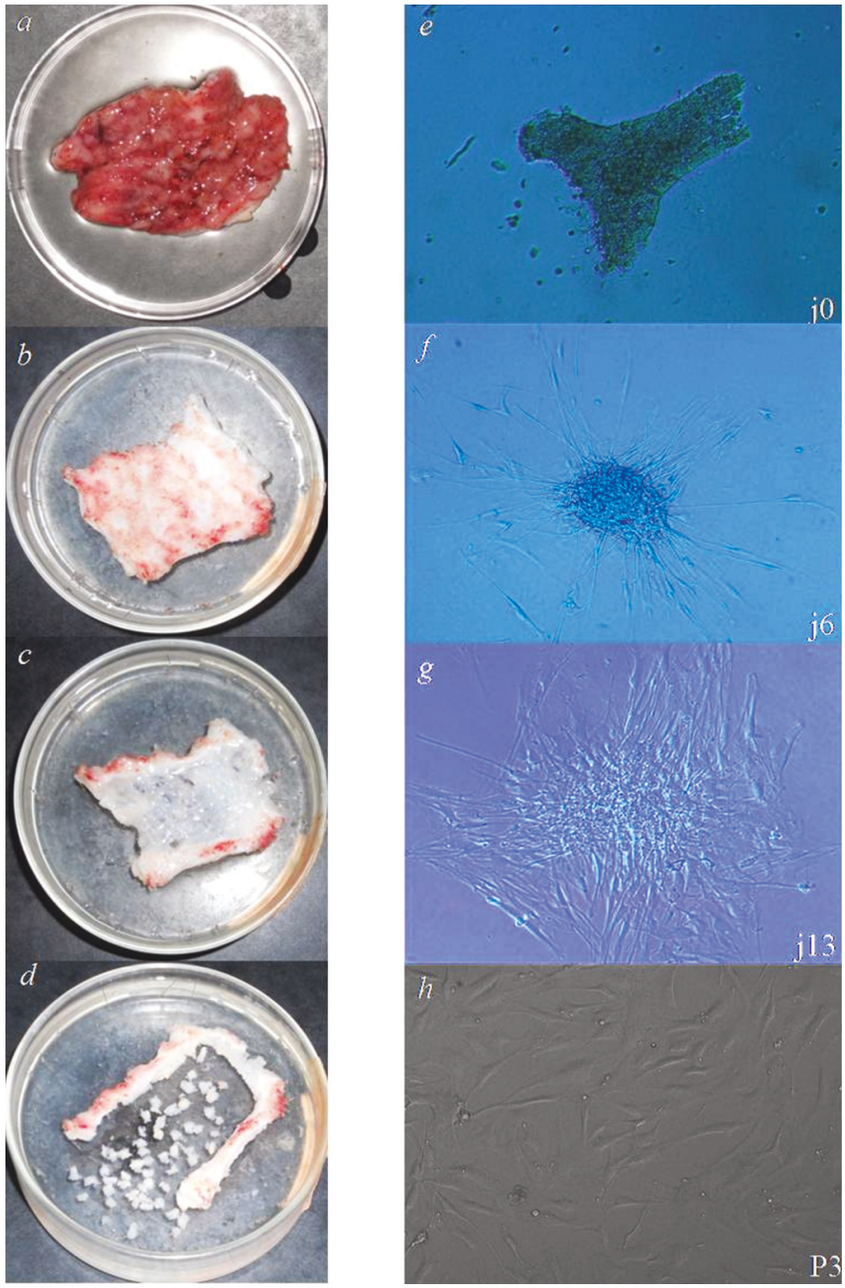


Figure 27-18 Illustration des différentes étapes de culture de cellules gliales entériques humaines. (*a*) Fragment d'iléon humain, muqueuse exposée. (*b*) Le même fragment après avoir retiré la muqueuse. (*c*) Le même fragment avec le plexus myentérique associé au muscle longitudinal (PMML). (*d*) Après découpe de morceaux de 5mm. (*e*) Un ganglion myentérique isolé. (*f*) Un ganglion après 6 jours de culture. (*g*) Un ganglion après 13 jours de culture. (*h*) Cellules gliales entériques humaines en culture (P3 : passage 3).

Modèles de co-culture avec les cellules épithéliales

Pour disséquer *ex vivo*, les mécanismes régulant les interactions SNE-barrière épithéliale intestinale, différents modèles ont été mis en place. Holland-Cunz et al. (2004) ont décrit comment réorganiser une co-culture tridimensionnelle d'entérocytes et de SNE (Holland-Cunz et al., 2004). Le SNE est mis en culture dans un milieu gélifié à la surface duquel sont ensemencés les entérocytes. Cette méthode est utile pour étudier la croissance des prolongements neuro-gliaux, mais ne permet pas d'isoler les entérocytes du SNE pour des analyses ultérieures de signalisation, ou même des analyses de résistance et de perméabilité de la monocouche épithéliale. À ces fins, un système très évolutif de co-culture utilisant des inserts (Transwell™) ou filtres poreux (4 µm) a été développé. Les IEC sont ensemencées au fond des inserts placés dans des puits de culture cellulaire. L'insert limite ainsi la chambre supérieure d'où l'on accède au côté apical des cellules, et la chambre inférieure au contact de la membrane baso-latérale des cellules (**figure 27-19**). Selon la densité des cellules ensemencées, le temps et le milieu de culture, ces inserts peuvent servir à l'étude des processus de prolifération et différenciation des cellules épithéliales (Neunlist et al., 2007 ; Neunlist et al., 2008 ; Bach-Ngohou et al., 2010), de réparation (Van

Culture des cellules animales.indd 30 09/06/14 14:55

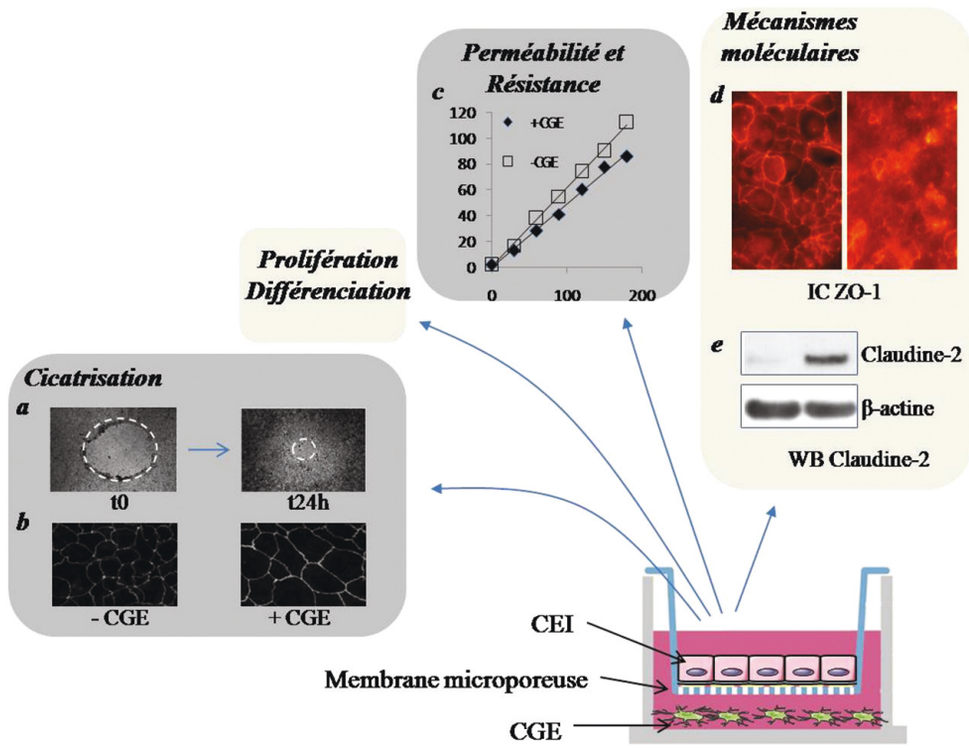


Figure 27-19 Illustration des différentes analyses fonctionnelles réalisables sur des CEI en co-culture avec des cellules gliales entériques humaines. (*a*) Cicatrisation. (*b*) Immunomarquage ZO-1 pour étudier l'étalement cellulaire. (*c*) La pente de diffusion de l'acide sulfonique représente la perméabilité. (*d*) Immunomarquage ZO-1 anormal à droite. (*e*) Analyse de l'expression de protéine des jonctions comme la claudine-2.

Landeghem et al., 2011), de résistance ou de perméabilité de la barrière épithéliale intestinale (*voir* figure 27-19). Au fond des puits, sont cultivées les cellules épithéliales intestinales afin de mesurer l'impact des facteurs solubles qu'elles produisent sur l'épithélium. De plus, ce système permet des approches pharmacologiques et l'analyse ultérieure des IEC et/ou des cellules gliales entériques.

Conclusion

De par la diversité des tissus qui le composent et son taux de renouvellement, le système intestinal représente un modèle de choix pour étudier les processus de prolifération, de différenciation et les différentes fonctions d'un épithélium. Pendant longtemps, les lignées transformées ont constitué les principaux modèles d'étude de la régulation et de la fonction du système digestif. Les nombreux travaux réalisés avec ces lignées ont permis une meilleure compréhension des facteurs qui régulent ces différents processus et ont contribué à l'amélioration des modèles d'étude. Depuis quelques années, différentes méthodes ont permis l'isolement de cellules normales pouvant reproduire en culture (et à long terme) les processus physiologiques de différenciation des multiples types cellulaires présents dans l'épithélium intestinal. Cependant, ces nouveaux modèles cellulaires dérivent tous de cellules fœtales dont les caractéristiques fonctionnelles et les besoins trophiques sont différents des cellules adultes. Le défi reste entier d'isoler et de maintenir en culture des cellules coliques ou d'intestin grêle adulte. Les nouvelles approches de sélection et de culture des cellules souches en organoïdes pourraient résoudre une partie de ces lacunes.

Les différents modèles générés représentent l'ensemble des compartiments fonctionnels de l'axe crypte-villus :

— IEC ou HIEC, les cellules progénitrices des cryptes ;

— tsFHI, les HIEC à la température non permissive et les cellules du haut des cryptes à la température permissive (SI, perte capacité proliférative).

— PCDE, les cellules retrouvées dans les villosités qui peuvent être maintenues en culture une dizaine de jours. Cette lignée permet de valider les modèles d'adénocarcinomes coliques différenciés (Caco-2).

L'ensemble de ces modèles qui reproduisent l'axe crypte-villus dans son intégrité permet d'étudier séparément la prolifération, l'arrêt de croissance, l'initiation de la différenciation ou des états de différenciation plus avancés, alors que ces processus sont graduels et hétérogènes dans

Culture des cellules animales.indd 31 09/06/14 14:55

la lignée Caco-2. Selon la question biologique posée, il est donc important d'adopter le modèle le plus approprié, de même que les conditions de culture.

Les cultures primaires ou les lignées cellulaires ayant pour origine l'endoderme embryonnaire ou des cellules des cryptes ne peuvent aboutir spontanément qu'à une seule population de cellules épithéliales, les entérocytes, malgré leur caractère pluripotent. Toutefois, cette différenciation entérocytaire est limitée. Le processus de différenciation peut être complété et accéléré en présence d'un support fibroblastique en contact direct avec les cellules épithéliales ou en plaçant ces cellules dans un environnement 3D plus complexe. Dans ces conditions, les différents types de cellules épithéliales sont générés. Cela s'explique par la nécessité d'une implication séquentielle de facteurs de transcription, de facteurs humoraux transportés par la vascularisation, et par la présence de MEC dont une partie est secrétée par les fibroblastes.

Le système intestinal est à l'interface de plusieurs systèmes tels que les systèmes nerveux et immunitaires. Ces différents modèles associés à des expériences de co-culture offrent une possibilité d'approche de l'importance du SNE sur le renouvellement et la fonction de l'épithélium, de même que le contrôle des cellules épithéliales sur l'activation du système immunitaire ou sa régulation, et *vice versa* (interactions réciproques entre les différents systèmes).

Le tube digestif est un système complexe qui inclut différents acteurs (les protéines de la lame basale et leurs récepteurs), de multiples voies de signalisation et l'expression de gènes spécifiques. Plusieurs partenaires cellulaires participent à la mise en place et au maintien de l'épithélium intestinal. Différents procédés de culture cellulaire permettent de mieux comprendre les interactions entre ces différents tissus et leur rôle respectif dans l'homéostasie intestinale. Même si de nombreuses avancées ont été faites, les expériences de transcriptome ou analogues révèlent l'existence de nombreux gènes importants pour le développement et la fonction du tube digestif qui n'ont pas encore été explorés.

En plus des apports fondamentaux sur la compréhension de mécanismes physiologiques, les nouveaux modèles cellulaires d'étude de l'épithélium intestinal offrent des outils pertinents pour la compréhension des pathologies digestives comme les cancers colorectaux ou les maladies inflammatoires de l'intestin, et permettent également d'effectuer des tests thérapeutiques.

RÉFÉRENCES

Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, et al. (2010) Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. FASEB J. 24:1082-94.

Abdo H, Mahe MM, Derkinderen P, Bach-Ngohou K, Neunlist M, Lardeux B. (2012) The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. J Physiol. 590:2739-50.

Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV, Srinivasan S. (2006) GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. J Clin Invest. 116:344-56.

Anitha M, Joseph I, Ding X, Torre ER, Sawchuk MA, Mwangi S, et al. (2008) Characterization of fetal and postnatal enteric neuronal cell lines with improvement in intestinal neural function. Gastroenterology. 134:1424-35.

Artursson P, Karlsson J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. Biochem Biophys Res Commun. 175:880-5.

Augeron C, Laboisse CL. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. Cancer Res. 44:3961-9.

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. (2005) A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol. 24:326-32.

Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, et al. (2010) Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. J Physiol. 588:2533-44.

Bannerman PG, Mirsky R, Jessen KR. (1988) Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. Brain Res. 440:99-108.

Bara J, Nardelli J, Gadenne C, Prade M, Burtin P. (1984) Differences in the expression of mucus-associated antigens between proximal and distal human colon adenocarcinomas. Br J Cancer. 49:495-501.

Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. 449:1003-7.

Barker N, van de Wetering M, Clevers H. (2008) The intestinal stem cell. Genes Dev. 22:1856-64.

Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, et al. (1999) Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. J Biol Chem. 274:29819-25.

Basson MD, Turowski G, Emenaker NJ. (1996) Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. Exp Cell Res. 225:301-5.

Beaulieu JF. (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. Prog Histochem Cytochem. 31:1-78.

Beaulieu JF. (1999) Integrins and human intestinal cell functions. Front Biosci. 4:D310-21.

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

Beck F, Stringer EJ. (2010) The role of Cdx genes in the gut and in axial development. Biochem Soc Trans. 38:353-7.

Benoit YD, Pare F, Francoeur C, Jean D, Tremblay E, Boudreau F, et al. (2010) Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 298:G504-17.

Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, Miquerol L, Kerneis S, Kraehenbuhl JP, et al. (1996) Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. Am J Physiol. 270:C1666-74.

Bernstein CN, Vidrich A. (1994) Isolation, identification, and culture of normal mouse colonic glia. Glia. 12:108-16.

Culture des cellules animales.indd 32 09/06/14 14:55

Bjerknes M, Cheng H. (1981) The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. Am J Anat. 160:51-63.
Bjerknes M, Cheng H. (1999) Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. Gastroenterology. 116:7-14.
Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F, Comoglio PM. (1994) Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. J Biol Chem. 269:12846-51.
Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. (2003) Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. Development. 130:6387-400.
Bouatrouss Y, Herring-Gillam FE, Gosselin J, Poisson J, Beaulieu JF. (2000) Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. Am J Pathol. 156:45-50.
Bouziges F, Simo P, Simon-Assmann P, Haffen K, Kedinger M. (1991) Altered deposition of basement-membrane molecules in co-cultures of colonic cancer cells and fibroblasts. Int J Cancer. 48:101-8.
Bracke ME, Boterberg T, Bruyneel EA, Mareel MM. (2001a) Collagen invasion assay. Methods Mol Med. 58:81-9.
Bracke ME, Boterberg T, Mareel MM. (2001b) Chick heart invasion assay. Methods Mol Med. 58:91-102.
Buckingham ME, Meilhac SM. (2011) Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior. Dev Cell. 21:394-409.
Canonici A, Siret C, Pellegrino E, Pontier-Bres R, Pouyet L, Montero MP, et al. (2011) Saccharomyces boulardii improves intestinal cell restitution through activation of the α2β1 integrin collagen receptor. PLoS One. 6:e18427.
Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 108:11452-7.
Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. Cancer Res. 48:1936-42.
Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, Rousset M. (1994) Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation. J Cell Sci. 107:213-25.
Chartier NT, Laine M, Gout S, Pawlak G, Marie CA, Matos P, et al. (2006) Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. J Cell Sci. 119:31-46.
Che CM, Li CH, Chui SS, Roy VA, Low KH. (2008) Homoleptic copper(I) arylthiolates as a new class of p-type charge carriers: Structures and charge mobility studies. Chemistry. 14:2965-75.
Cheng H, Leblond CP. (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. 141:537-61.
Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, Neunlist M. (2008) Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. J Physiol. 586:1963-75.
Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK. (1993) Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. Gastroenterology. 105:93-101.
Cirillo C, Sarnelli G, Turco F, Mango A, Grosso M, Aprea G, et al. (2011) Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. Neurogastroenterol Motil. 23:e372-82.
de Both NJ, Vermey M, Dinjens WN, Bosman FT. (1999) A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines. Br J Cancer. 81:934-41.
de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, et al. (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature. 476:293-7.
Delie F, Rubas W. (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 14:221-86.
Desloges N, Basora N, Perreault N, Bouatrouss Y, Sheppard D, Beaulieu JF. (1998) Regulated expression of the integrin alpha-9beta1 in the epithelium of the developing human gut and in intestinal cell lines: Relation with cell proliferation. J Cell Biochem. 71:536-45.
Dhawan S, Cailotto C, Harthoorn LF, de Jonge WJ. (2012) Cholinergic signalling in gut immunity. Life Sci. 91:1038-42.
Dignass AU, Podolsky DK. (1993) Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: Central role of transforming growth factor beta. Gastroenterology. 105:1323-32.
Duluc I, Freund JN, Leberquier C, Kedinger M. (1994) Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. J Cell Biol. 126:211-21.
Duluc I, Lorentz O, Fritsch C, Leberquier C, Kedinger M, Freund JN. (1997) Changing intestinal connective tissue interactions alters homeobox gene expression in epithelial cells. J Cell Sci. 110:1317-24.
Durbeej M. (2010) Laminins. Cell Tissue Res. 339:259-68.
Dydensborg AB, Teller IC, Basora N, Groulx JF, Auclair J, Francoeur C, et al. (2009a) Differential expression of the integrins alpha6A-beta4 and alpha6Bbeta4 along the crypt-villus axis in the human small intestine. Histochem Cell Biol. 131:531-6.
Dydensborg AB, Teller IC, Groulx JF, Basora N, Pare F, Herring E, et al. (2009b) Integrin alpha6Bbeta4 inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. BMC Cancer. 9:223.
Eccleston PA, Bannerman PG, Pleasure DE, Winter J, Mirsky R, Jessen KR. (1989) Control of peripheral glial cell proliferation: Enteric neurons exert an inhibitory influence on Schwann cell and enteric glial cell DNA synthesis in culture. Development. 107:107-12.
Eccleston PA, Jessen KR, Mirsky R. (1987) Control of peripheral glial cell proliferation: A comparison of the division rates of enteric glia and Schwann cells and their response to mitogens. Dev Biol. 124:409-17.
Ericsson A, Kotarsky K, Svensson M, Sigvardsson M, Agace W. (2006) Functional characterization of the CCL25 promoter in small intestinal epithelial cells suggests a regulatory role for caudal-related homeobox (Cdx) transcription factors. J Immunol. 176:3642-51.
Escaffit F, Pare F, Gauthier R, Rivard N, Boudreau F, Beaulieu JF. (2006) Cdx2 modulates proliferation in normal human intestinal epithelial crypt cells. Biochem Biophys Res Commun. 342:66-72.
Fabricant RN, De Larco JE, Todaro GJ. (1977) Binding and thermal dissociation of nerve growth factor and its receptor on human melanoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 79:299-304.
Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahe MM, et al. (2011) Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: A role for S-nitrosoglutathione. Gut. 60:473-84.
Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice J Natl Cancer Inst. 59:221-6.

Culture des cellules animales.indd 33 09/06/14 14:55

Fogh J, Trempe G. (1975) Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Publishing. Corp, pp. 115-141.
Fonti R, Latella G, Bises G, Magliocca F, Nobili F, Caprilli R, Sambuy Y. (1994) Human colonocytes in primary culture: A model to study epithelial growth, metabolism and differentiation. Int J Colorectal Dis. 9:13-22.
Francoeur C, Bouatrouss Y, Seltana A, Pinchuk IV, Vachon PH, Powell DW, et al. (2009) Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 136:268-77.
Fritsch C, Orian-Rousseaul V, Lefebvre O, Simon-Assmann P, Reimund JM, Duclos B, Kedinger M. (1999) Characterization of human intestinal stromal cell lines: Response to cytokines and interactions with epithelial cells. Exp Cell Res. 248:391-406.
Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS. (1997) Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. Gastroenterology. 112:826-38.
Fukamachi H. (1992) Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. J Cell Sci. 103:511-9.
Furness JB. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 9:286-94.
Gao N, White P, Kaestner KH. (2009) Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. Dev Cell. 16:588-99.
Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R. (2001) Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. Oncogene. 20:5025-32.
Gilcrease MZ. (2007) Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett. 247:1-25.
Gomes P, Chevalier J, Boesmans W, Roosen L, van den Abbeel V, Neunlist M, et al. (2009) ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. Neurogastroenterol Motil. 21:870-e862.
Gout S, Marie C, Laine M, Tavernier G, Block MR, Jacquier-Sarlin M. (2004) Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: Biochemical changes and strength increases of adherens junctions. Exp Cell Res. 299:498-510.
Gout SP, Jacquier-Sarlin MR, Rouard-Talbot L, Rousselle P, Block MR. (2001) RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. Mol Biol Cell. 12:3268-81.
Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, Levine AD. (1998) New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. Am J Pathol. 153:53-62.
Haffen K, Kedinger M, Simon-Assmann PM, Lacroix B. (1982) Mesenchyme-dependent differentiation of intestinal brush-border enzymes in the gizzard endoderm of the chick embryo. Prog Clin Biol Res. 85:261-70.
Hamill KJ, Kligys K, Hopkinson SB, Jones JC. (2009) Laminin deposition in the extracellular matrix: A complex picture emerges. J Cell Sci. 122:4409-17.
Hauri HP, Roth J, Sterchi EE, Lentze MJ. (1985) Transport to cell surface of intestinal sucrase-isomaltase is blocked in the Golgi apparatus in a patient with congenital sucrase-isomaltase deficiency. Proc Natl Acad Sci USA. 82:4423-7.
Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM, Milbrandt J. (1998) Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. Dev Biol. 200:116-29.
Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 96:736-49.
Holland-Cunz S, Bainczyk S, Hagl C, Wink E, Wedel T, Back W, Schafer KH. (2004) Three-dimensional co-culture model of enterocytes and primary enteric neuronal tissue. Pediatr Surg Int. 20:233-7.
Iizuka M, Konno S. (2011) Wound healing of intestinal epithelial cells. World J Gastroenterol. 17:2161-71.
Itzkovitz S, Lyubimova A, Blat IC, Maynard M, van Es J, Lees J, et al. (2012) Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. Nat Cell Biol. 14:106-14.
Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, et al. (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. EMBO J. 21:6338-47.
Jessen KR, Saffrey MJ, Baluk P, Hanani M, Burnstock G. (1983) The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and the retention of biochemical and morphological differentiation. Brain Res. 262:49-62.
Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, et al. (2011) Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. Nat Med. 17:1225-7.
Kedinger M, Duluc I, Fritsch C, Lorentz O, Plateroti M, Freund JN. (1998a) Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. Ann N Y Acad Sci. 859:1-17.
Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P. (1987a) Intestinal tissue and cell cultures. Differentiation. 36:71-85.
Kedinger M, Lefebvre O, Duluc I, Freund JN, Simon-Assmann P. (1998b) Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353:847-56.
Kedinger M, Simon PM, Grenier JF, Haffen K. (1981) Role of epithelial--mesenchymal interactions in the ontogenesis of intestinal brush-border enzymes. Dev Biol. 86:339-47.
Kedinger M, Simon-Assmann P, Alexandre E, Haffen K. (1987b) Importance of a fibroblastic support for in vitro differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. Cell Differ. 20:171-82.
Kedinger M, Simon-Assmann P, Bouziges F, Haffen K. (1988) Epithelial-mesenchymal interactions in intestinal epithelial differentiation. Scand J Gastroenterol Suppl. 151:62-9.
Kedinger M, Simon-Assmann PM, Lacroix B, Marxer A, Hauri HP, Haffen K. (1986) Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells. Dev Biol. 113:474-83.
Kerneis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. (1997) Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. Science. 277:949-52.
Kerneis S, Pringault E. (1999) Plasticity of the gastrointestinal epithelium: The M cell paradigm and opportunism of pathogenic microorganisms. Semin Immunol. 11:205-15.
Kikkawa H, Miyamoto D, Imafuku H, Koike C, Suzuki Y, Okada S, et al. (1998) Role of sialylglycoconjugate(s) in the initial phase of metastasis of liver-metastatic RAW117 lymphoma cells. Jpn J Cancer Res. 89:1296-305.
Koo BK, Stange DE, Sato T, Karthaus W, Farin HF, Huch M, et al. (2012) Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures. Nat Methods. 9:81-3.
Korsak K, Silva AT, Saffrey MJ. (2012) Differing effects of NT-3 and GDNF on dissociated enteric ganglion cells exposed to hydrogen peroxide in vitro. Neurosci Lett. 517:102-6.
Kretzschmar K, Watt FM. (2012) Lineage tracing. Cell. 148:33-45.
Kurokowa M, Lynch K, Podolsky DK. (1987) Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: Transforming growth

Culture des cellules animales.indd 34 09/06/14 14:55

factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 142:775-82.
Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P, Pachnis V. (2011) Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. J Clin Invest. 121:3412-24.
Le Beyec J, Delers F, Jourdant F, Schreider C, Chambaz J, Cardot P, Pincon-Raymond M. (1997) A complete epithelial organization of Caco-2 cells induces I-FABP and potentializes apolipoprotein gene expression. Exp Cell Res. 236:311-20.
Le Beyec J, Ribeiro A, Schreider C, Chambaz J, Rousset M, Pinçon-Raymond M, Cardot P. (1999) Illegitimate expression of apolipoprotein A-II in Caco-2 cells is due to chromatin organization. Exp Cell Res. 247:373-9.
Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 36:4562-9.
Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. (2007) Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. BMC Genomics. 8:91.
Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. Cancer Res. 50:6334-43.
Lesuffleur T, Kornowski A, Augeron C, Dussaulx E, Barbat A, Laboisse C, Zweibaum A. (1991a) Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. Int J Cancer. 49:731-7.
Lesuffleur T, Kornowski A, Luccioni C, Muleris M, Barbat A, Beaumatin J, et al. (1991b) Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. Int J Cancer. 49:721-30.
Levy E, Bendayan M. (2000) Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport. Microsc Res Tech. 49:374-82.
Levy E, Ménard D. (2000) Developmental aspects of lipid and lipoprotein synthesis and secretion in human gut. Microsc Res Tech. 49:363-73.
Li VS, Clevers H. (2012) In vitro expansion and transplantation of intestinal crypt stem cells. Gastroenterology. 143:30-4.
Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD, Winton DJ. (2010) Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. Science. 330:822-5.
Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. J Cell Biol. 139:1553-65.
Lotz MM, Nusrat A, Madara JL, Ezzell R, Wewer UM, Mercurio AM. (1997) Intestinal epithelial restitution. Involvement of specific laminin isoforms and integrin laminin receptors in wound closure of a transformed model epithelium. Am J Pathol. 150:747-60.
Lundgren O, Jodal M, Jansson M, Ryberg AT, Svensson L. (2011) Intestinal epithelial stem/progenitor cells are controlled by mucosal afferent nerves. PLoS One. 6:e16295.
Matteoli G. (2011) Enteric glial cells: New players in mucosal defence against bacteria? Gut. 60:429-30.
Metzger M, Bareiss PM, Danker T, Wagner S, Hennenlotter J, Guenther E, et al. (2009) Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. Gastroenterology. 137:2063-73.
Miner JH. (2008) Laminins and their roles in mammals. Microsc Res Tech. 71:349-56.
Miner JH, Yurchenco PD. (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 20:255-84.
Moriez R, Abdo H, Chaumette T, Faure M, Lardeux B, Neunlist M. (2009) Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 382:577-82.
Murakami H, Masui H. (1980) Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. Proc Natl Acad Sci USA. 77:3464-8.
Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, et al. (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292:G231-41.
Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T. (2008) Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. J Intern Med. 263:577-83.
Olsen J, Lefebvre O, Fritsch C, Troelsen JT, Orian-Rousseau V, Kedinger M, Simon-Assmann P. (2000) Involvement of activator protein 1 complexes in the epithelium-specific activation of the laminin gamma2-chain gene promoter by hepatocyte growth factor (scatter factor). Biochem J. 347:407-17.
Orian-Rousseau V, Aberdam D, Rousselle P, Messent A, Gavrilovic J, Meneguzzi G, et al. (1998) Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha-2beta1. J Cell Sci. 111:1993-2004.
Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P, Beaulieu JF. (2000) Human cell models to study small intestinal functions: Recapitulation of the crypt-villus axis. Microsc Res Tech. 49:394-406.
Panneerselvam M, Sahai A, Salomon DS. (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. 277:377-83.
Paul EC, Hochman J, Quaroni A. (1993) Conditionally immortalized intestinal epithelial cells: Novel approach for study of differentiated enterocytes. Am J Physiol. 265:C266-78.
Peignon G, Thenet S, Schreider C, Fouquet S, Ribeiro A, Dussaulx E, et al. (2006) E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: A role for the hepatic nuclear factor 4. J Biol Chem. 281:3560-8.
Perreault N, Beaulieu JF. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. Exp Cell Res. 224:354-64.
Perreault N, Beaulieu JF. (1998) Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. Exp Cell Res. 245:34-42.
Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al. (1983) Enterocyte-like differenciation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Bio Cell. 47:323-30.
Pinçon-Raymond M, Vicart P, Bois P, Chassande O, Romey G, Varadi G, et al. (1991) Conditional immortalization of normal and dysgenic mouse muscle cells by the SV40 large T antigen under the vimentin promoter control. Dev Biol. 148:517-28.
Plateroti M, Freund JN, Leberquier C, Kedinger M. (1997) Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. J Cell Sci. 110:1227-38.
Potten CS, Hume WJ, Reid P, Cairns J. (1978) The segregation of DNA in epithelial stem cells. Cell. 15:899-906.

Culture des cellules animales.indd 35 09/06/14 14:55

Potten CS, Kovacs L, Hamilton E. (1974) Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. Cell Tissue Kinet. 7:271-83.
Quaroni A, Beaulieu JF. (1997) Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 113:1198-213.
Quaroni A, Tian JQ, Goke M, Podolsky DK. (1999) Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. Am J Physiol. 277:G1027-40.
Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. J Cell Biol. 80:248-65.
Quinlan JM, Yu WY, Hornsey MA, Tosh D, Slack JM. (2006) In vitro culture of embryonic mouse intestinal epithelium: Cell differentiation and introduction of reporter genes. BMC Dev Biol. 6:24.
Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. (2003) Cell migration: Integrating signals from front to back. Science. 302:1704-9.
Ruemmele FM, Dionne S, Levy E, Seidman EG. (1999a) TNFalpha-induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 260:159-66.
Ruemmele FM, Gurbindo C, Mansour AM, Marchand R, Levy E, Seidman EG. (1998) Effects of interferon gamma on growth, apoptosis, and MHC class II expression of immature rat intestinal crypt (IEC-6) cells. J Cell Physiol. 176:120-6.
Ruemmele FM, Russo P, Beaulieu J, Dionne S, Levy E, Lentze MJ, Seidman EG. (1999b) Susceptibility to FAS-induced apoptosis in human nontumoral enterocytes: Role of costimulatory factors. J Cell Physiol. 181:45-54.
Ruhl A, Trotter J, Stremmel W. (2001) Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. Neurogastroenterol Motil. 13:95-106.
Saaf AM, Halbleib JM, Chen X, Yuen ST, Leung SY, Nelson WJ, Brown PO. (2007) Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. Mol Biol Cell. 18:4245-60.
Sambuy Y, De Angelis I. (1986) Formation of organoid structures and extracellular matrix production in an intestinal epithelial cell line during long-term in vitro culture. Cell Differ. 19:139-47.
Sancho E, Batlle E, Clevers H. (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 20:695-723.
Sangiorgi E, Capecchi MR. (2008) Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. Nat Genet. 40:915-20.
Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, et al. (2011a) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology. 141:1762-72.
Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, et al. (2011b) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. Nature. 469:415-8.
Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 459:262-5.
Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, et al. (2007a) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. Gastroenterology. 132:1344-58.
Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M. (2007b) Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. Lab Invest. 87:731-6.
Schafer KH, Hagl CI, Rauch U. (2003) Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. Pediatr Surg Int. 19:340-4.
Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, Salomon A, Korber J. (2000) Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. Int J Colorectal Dis. 15:39-48.
Schreider C, Peignon G, Thenet S, Chambaz J, Pincon-Raymond M. (2002) Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. J Cell Sci. 115:543-52.
Seltana A, Basora N, Beaulieu JF. (2010) Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. Wound Repair Regen. 18:114-22.
Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. (2010) The final steps of integrin activation: The end game. Nat Rev Mol Cell Biol. 11:288-300.
Silva AT, Wardhaugh T, Dolatshad NF, Jones S, Saffrey MJ. (2008) Neural progenitors from isolated postnatal rat myenteric ganglia: Expansion as neurospheres and differentiation in vitro. Brain Res. 1218:47-53.
Simo P, Bouziges F, Lissitzky JC, Sorokin L, Kedinger M, Simon-Assmann P. (1992) Dual and asynchronous deposition of laminin chains at the epithelial-mesenchymal interface in the gut. Gastroenterology. 102:1835-45.
Simon-Assmann P, Bolcato-Bellemin AL, Klein A, Kedinger M. (2009) Tissue recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. Methods Mol Biol. 522:309-18.
Simon-Assmann P, Kedinger M. (1993) Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. Semin Cell Biol. 4:221-30.
Simon-Assmann P, Kedinger M. (2000) Tissue recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. Methods Mol Biol. 139:311-9.
Simon-Assmann P, Spenle C, Lefebvre O, Kedinger M. (2010) The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. Prog Mol Biol Transl Sci. 96:175-206.
Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. (2007) In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. Cell Biol Toxicol. 23:241-56.
Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, et al. (1998) Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine. Dev Dyn. 212:437-47.
Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, et al. (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. Cell. 143:134-44.
Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, Neunlist M. (2010) Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. Gastroenterology. 138:1772-82.
Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. (2011) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. Nature. 470:105-9.
Spenle C, Hussenet T, Lacroute J, Lefebvre O, Kedinger M, Orend G, Simon-Assmann P. (2012) Dysregulation of laminins in intestinal inflammation. Pathol Biol (Paris). 60:41-7.
Sträter J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Möller P. (1996) Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. Gastroenterology. 110:1776-84.
Stutzmann J, Bellissent-Waydelich A, Fontao L, Launay JF, Simon-Assmann P. (2000) Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. Microsc Res Tech. 51:179-90.

Culture des cellules animales.indd 36 09/06/14 14:55

Suh E, Traber PG. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. Mol Cell Biol. 16:619-25.
Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, Wang Q, Lu MM, Epstein JA. (2011) Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. Science. 334:1420-4.
Teller IC, Auclair J, Herring E, Gauthier R, Menard D, Beaulieu JF. (2007) Laminins in the developing and adult human small intestine: Relation with the functional absorptive unit. Dev Dyn. 236:1980-90.
Teller IC, Beaulieu JF. (2001) Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. Expert Rev Mol Med. 2001:1-18.
Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, de Sauvage FJ. (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. Nature. 478:255-9.
Tian JQ, Quaroni A. (1999) Involvement of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) in intestinal epithelial cell differentiation. American J Physiol. 276:C1245-58.
Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD. (1976) Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. In Vitro. 12:180-91.
Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM, Harris JA. (1974) Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. J Natl Cancer Inst. 52:1101-10.
Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, et al. (2005) Laminin isoforms: Biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. Exp Cell Res. 303:494-503.
Turck N, Lefebvre O, Gross I, Gendry P, Kedinger M, Simon-Assmann P, Launay JF. (2006) Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. J Cell Physiol. 206:545-55.
Turck N, Richert S, Gendry P, Stutzmann J, Kedinger M, Leize E, et al. (2004) Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells. Proteomics. 4:93-105.
Vachon PH, Beaulieu JF. (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. Gastroenterology. 103:414-23.
van der Flier LG, Clevers H. (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Annu Rev Physiol. 71:241-60.
Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, et al. (2011) Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 300:G976-87.
Van Landeghem L, Mahe MM, Teusan R, Leger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M. (2009) Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: Impact on intestinal epithelial barrier functions. BMC Genomics. 10:507.
Virtanen I, Gullberg D, Rissanen J, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Laitinen LA, et al. (2000) Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. Exp Cell Res. 257:298-309.
Volpe DA. (2008) Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. J Pharm Sci. 97:712-25.
Yasugi S, Mizuno T. (2008) Molecular analysis of endoderm regionalization. Dev Growth Differ. 50:S79-96.
Yurchenco PD, Patton BL. (2009) Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. Curr Pharm Des. 15:1277-94.
Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, et al. (2009) Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. Nature. 457:603-7.
Zweibaum A. (1993) [Differentiation of human colon cancer cells: A new approach to colon cancer]. Bull Acad Natl Med. 177:63-71; discussion 71-63.

Culture des cellules animales.indd 37 09/06/14 14:55

Dynamic regulation of adherens junctions: implication in cell differentiation and tumor development

Marjolaine A. Pelissier-Rota[1,2], Nicolas T. Chartier[2,3] and Muriel R. Jacquier-sarlin[1,2]

Affiliations:
[1]Centre de Recherche Inserm U836, Institute of Neurosciences, Grenoble, France; [2]University Joseph Fourier of Grenoble, Grenoble, France, [3] INSERM, U823; Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38700, France.

Abbreviations: Ach: acetylcholine, ADAM: a disintegrin and metalloprotease, AJ: adherens junction, AOM: Azoxymethane, APC: adenomatous polyposis coli, ARM: armadillo,CAC: colitis associated cancer, CAM: cell-cell adhesion molecule, CBD: c-terminal catenin-binding domain,cdc42: cell division control protein 42 homolog, CD: Crohn"disease, Cdx2: caudal-type homeobox transcription factor), CH: cadherin homology region,CRC: colorectal cancer, CREB: cyclic AMP response element binding protein, CRF2: corticotropin releasing factor receptor 2, CtBP: c-terminal binding protein, DNMT: DNA methyl transferase, DSS: dextran sodium sulfate, EC: extracellular repeats domain,EGF: epidermal growth factor, ERK: extracellular signal-regulated kinase, EpiSC: epiblast-like stem cell, ECM: extracellular matrix, EMT: epithelial to mesenchymal transition, Eph: erythropoietin producing hepathocytes , ESC: embryonic stem cell,FAK: focal adhesion kinase, FGF: fibroblast growth factor,Gastrointestinal: GI, GEF: GTPase-specific nucleotideexchange factor, GF: growth factor, GLIS2: gli- similar protein 2, GSK3: Glycogen synthase kinase 3,GTP: guanosine tri phosphate, GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor, HDACS: histone deacetylase, HGF: Hepatocyte growth factor, IBD: inflammatory bowel disease, IEC: intestinal epithelial cell, ILK: integrin linked kinase, INFα: interferon alpha, iPSC: pluripotent stem cell, JMD: juxtamembrane domain, Klk6: kallikrein 6,LI-cadherin: liver-intestine cadherin, mAChR: muscarinic acetylcholine receptor, MeCP2: methyl-CpG-binding protein, MET: mesenchymal to epithelial transition, miRNA: microRNA,Mi2/ NuRD: MI2/ nucleosome remodeling and deacylase, MLC: myosin light chain, MMP: matrix metalloproteinase, mTOR: mammalian target of rapamycin, MD: maternal deprivation, NLS: nuclear localization sequence,PAR: PARtitionning defective mutant, PI3K: phosphoinositide-3-kinase, PJS: Peutz Jehgers syndrome, p120ctn: p120 catenin, PRC2: polycomb repressive complex 2, PSEN: presenilin, PSP: serine/ threonine phosphatase, PTEN:, PTP: protein tyrosine phosphatase, Rac: Ras-related C3 botulinum toxinsubstrate,ROK:Rho-associated protein kinase**,**sE-cadh: soluble E-cadherin, SAHA: suberoylanilide hydoxamic acids, Src:homologue of the Rous sarcoma virus oncogene protein, sN-cad: soluble N-cadherin, SPARC: secreted protein acidic and rich in cysteine, TCF/LEF: T cell factor/ Lymphoid enhancer factor, TJ: tight junction, TGF-β: transforming growth factor-β, UC: ulcerative colitis, Ucn: urocortin,ZEB: zinc finger E-box-binding homeoboxe.

Abstract:
Adherens junctions (AJ) are fundamental cellular subcompartments required for the integrity of animal tissues and organs. The core complex of AJ is formed of transmembrane cell-cell adhesion molecules, cadherins, and adaptor, the catenins that link the complex to cytoskeletal and regulatory networks in the cell. Clustering of these molecules at junctions induces signaling pathways that regulate cellular responses, with crucial effects on the physiology and pathology of the epithelium, from cell differentiation to tumor development. Loss of E-cadherin expression is a hallmark of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), the process allowing the dissemination and the invasion of metastatic

tumors. In this chapter, we focus on intestinal epithelium to highlight how cell-cell junction proteins, especially AJ proteins, interact together in normal and cancerous contexts to regulate major cellular processes such as cell differentiation and migration. For instance, imbalance in the signaling properties of catenins results in cell cycle deregulation during cancer and metastasis. We will also describe signaling and trafficking machineries that drive dynamic regulation of AJ and how these mechanisms are co-opted in cancer. In particular, the crosstalk between AJ, polarity proteins, extracellular matrix and microenvironment will be discussed. Recent evidences indicate that cell-cell junctions modulate chromatin function and mutually, we will also discuss epigenetic mechanisms that regulate AJ. Finally, we will examine more recent hypotheses about AJ implications in cancer stem cells and give an overview of cancer therapies that target cell-cell junction proteins.

Table of contents

1 Introduction 5

2. Structure and organization of adherens junctions 6
2.1 Interaction between neighboring cadherins: the pivotal role of Ectodomain 7
2.2 Interactions with the cytoplasmic domain of E-cadherin 8
2.2.1 β-catenin 9
2.2.2 p120ctn 9
2.2.3: α-catenin 11

3. Catenin-dependent signaling to and from AJ: roles in intestinal epithelium 11
3.1 β-catenin and the Wnt pathway 12
3.2 p120ctn: the multitasking partner 13
3.2.1 p120ctn at the junction 13
3.2.2 p120ctn and small GTPases 14
3.2.3 p120ctn and KAISO in the nucleus 15
3.2.4 p120ctn and microtubules 16

4. Dynamic regulation of Adherens Junctions 16
4.1 Regulation by polarity proteins17
4.1.1 PAR proteins 16
4.1.2 CRUMB and SCRIB complexes 17
4.2 Regulation by the extracellular matrix 18
4.3 Roles of Nectins 18
4.4 The dynamic actin cytoskeleton 22
4.5 Transcriptional regulation 23
4.6 Regulation by phosphorylation 24
4.6.1 Receptors with kinase activity 25
4.6.2 Phosphatase regulation 25
4.7 Regulation by endocytosis 27
4.7.1 Clathrin-mediated endocytosis pathway 30
4.7.2 Clathrin-independent endocytic pathways 30
4.8 Regulation by proteolysis 30
4.8.1 Cadherin ectodomain shedding 31
4.9.2 Proteolysis of the cytoplasmic domain of E-cadherin: gain of oncogenic function 31

5. Transcriptional and Epigenetic regulation of adherens junctions 33
5.1 Promoter methylation 35
5.2 Transcriptional repression 35
5.3 microRNAs 36

6. Role of AJ in intestine physiopathology: From development to colorectal cancer 37
6.1 Role in stem cell biology and embryology 38
6.2 Role in epithelial cell differentiation 38
6.3 Role in inflammation: Example of IBD 40
6.4 Role in colorectal cancer 41
6.4.1 Cadherins in Cancer 43
6.4.2 Catenins in Cancer 44
6.4.3 Polarity and cancer 45
6.4.4 Role of EPH receptor in cancer 46
6.5 The intriguing Liver-Intestine cadherin 47
6.6 EMT in physiological and pathological adherens junctions-dependent processes 48
6.6.1 Modification of adhesion process that occurs during EMT 49
6.6.2 EMT and CRC 50
6.7 Adherens junctions in collective migration 51

7. Stress as an example of environmental-mediated alteration of AJ 54
7-1 Stress as an inductor of cell permeability 54
7-2 Cross-talk between CRF and cholinergic systems 56
7.3 Intestinal microbiota 58
7.3.1 Probiotics 58
7.3.2 Microbiota and cancer 59

8. Adherens junctions as potential targets for colon cancer therapy 60
8.1 Soluble cadherins as cancer biomarkers 60
8.2 Chromatin modulating agents as target 61
8.2.1 DNA methyl transferase (DNMT) and colon cancer 61
8.2.2 HDAC and colon cancer 63
8.3 EMT as a potential therapeutic target 65
8.3.1 Cell adhesion molecules 65
8.3.2 Growth factors and tyrosine kinase 66
8.4 Stem cell as therapeutic target 68
8.5 Vitamine D and colorectal cancer 69

9. Conclusion 71

1 Introduction

Intestinal epithelial homeostasis and function depend on various cell populations distributed on the different layers that constitute the intestinal mucosa. These cells participate in the control of intestinal secretory, motor and immune functions as well as epithelial permeability. The main function

of the small intestine is dedicated to nutrient absorption during digestion, whereas the colon mainly functions to resorb water. This functional difference is reflected by the structure and composition of the epithelium. The small intestinal epithelium is organized in a glandular structure with crypts and finger like structures called villi that maximize the exchange surface. Villi are composed of various differentiated cells: absorptive enterocytes, mucus-secreting goblet cells, hormone-producing enteroendocrine cells. The colon is only constituted of crypts. This epithelium also constitutes a barrier against numerous antigenic stimulations, which separates immune cells from the potentially harmful luminal content such as solutes, microorganisms, and antigens. The importance of an intact mucosal layer is highlighted by pathological disorders such as inflammatory bowel disease (IBD), in which disruption of the epithelial barrier leads to severe inflammation of the submucosal tissue compartments(Clayburgh et al. 2004). Enterocytes are specialized cells characterized by structural features including polarized morphology and a complex set of cell–cell and cell-extracellular matrix junctions. They represent 80% of the cells forming the epithelium monolayers. They are derived from stem cells located in the crypts of Lieberkühn and differentiate as they migrate within three to five days toward the tip of the villus region where they are shed (Leblond& Stevens, 1948). During this directional cell migration, the epithelial integrity of the intestine has to be ensured. This requires the adhesive contacts to rearrange and adapt to different conditions in a highly dynamic way. These intercellular junctions, which consist of a plethora of membrane-associated and transmembrane proteins organized in spatially restricted complexes, provide mechanical strength by anchoring cell-cell contacts to the cytoskeleton. Adhesion complexes are also preferential sites for signal transduction controlling multiple aspects of the cellular behavior, mainly proliferation and differentiation(Mariadason et al. 2001; Laprise et al. 2002; Peignon et al. 2006). Three types of junctional complexes mainly execute cell-cell adhesion: tight junction types (TJs), adherens junctions (AJs) and desmosomes. Although each type of junction has its particular mechanism of formation, regulation and function, extensive communication between them mutually influences their dynamics and signaling properties. On the basis of pioneering experiments on E-cadherin blocking, it was thought for a long time that E-cadherin-dependent adhesion is a prerequisite for the assembly of other specialized cell-cell junctions (Gumbiner et al. 1988).

In this chapter, we will focus on the structural and regulatory components of AJ, and the interactions between them, collectively referred as the cadherin adhesome, or cadhesome (Zaidel-Bar 2013) (Figures 1 and 2). As the assembly and regulation of cohesive intercellular junctions is central to morphogenesis and tissue homeostasis, we will describe the complex crosstalk between AJ and polarity proteins, extracellular matrix proteins or molecules of the surrounding environment and their roles in the regulation of theses junctions. Finally, we will describe how AJ are altered in pathogenesis and discuss the strategies developed for the treatment of intestinal disorders associated with deregulation of adhesive systems.

2. Structure and organization of adherens junctions

Cadherins constitute a superfamily of Ca+-dependent cell-cell adhesion molecules, which comprises over 100 members(Takeichi, 1990; Wheelock and Johnson, 2003a; Goodwin and Yap, 2004; Hulpiau & van Roy, 2009).Typically, cadherin are able to bind a cadherin of the same type on an adjacent cell (homophilic interactions), but they can also interact with other types of cadherin or transmembrane receptors (heterophilic interactions).The binding between cadherin extracellular domains is relatively weak, but cell-cell adhesion may be strengthened by their lateral clustering, a process mediated by protein linkages between the cadherin cytoplasmic domain and the actin cytoskeleton (Jamora and Fuchs, 2002). Cadherins are classified within six subset: classical/ type I cadherins, atypical/ type II cadherins, desmocollins, desmogleins, protocadherins, Flamingo cadherins,

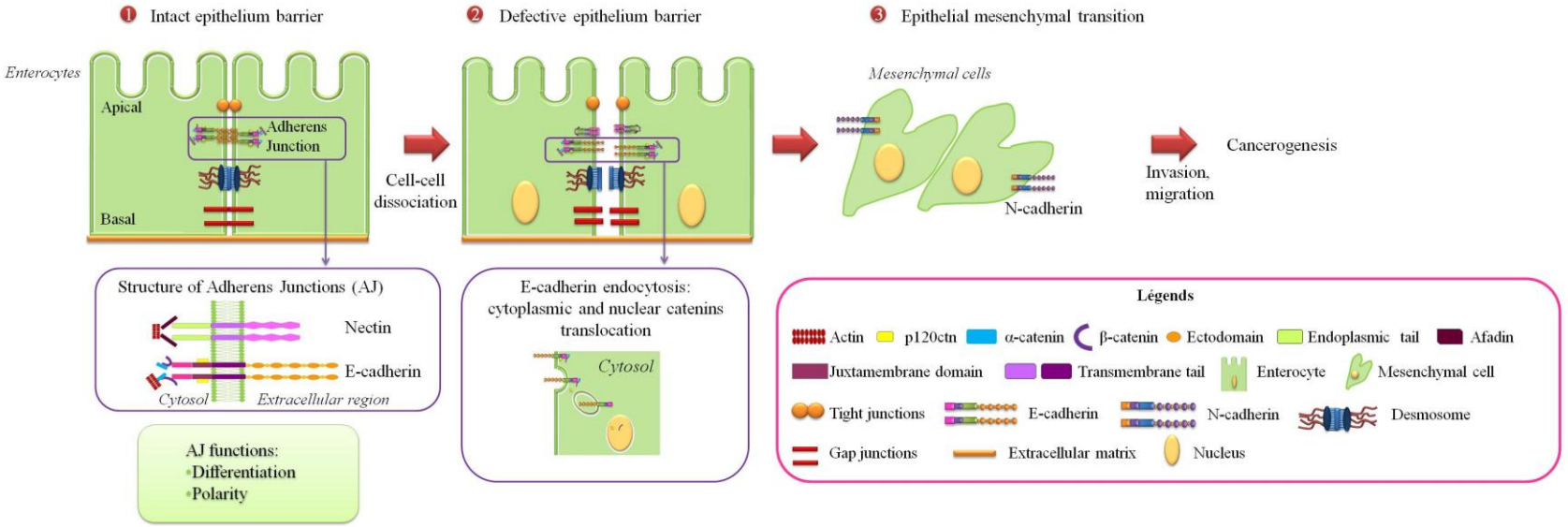


Figure1: Adherens junctions from epithelial differentiation to cancer development.

1) In normal differentiated adult epithelium, epithelial cells constitute a single layer of polarized cells maintained by various adhesive complexes such as tight junctions, gap junctions and adherens junctions. Most of these junctions are connected to the actin cytoskeleton. The adhesive core of AJ is composed by two transmembrane proteins: cadherins and nectins. Cadherin possess: i) an extracellular domain, which is subdivided in 5 ectodomains (EC1-EC5), each subset contains calcium-binding site.; ii) A short transmembrane domain; iii) A cytoplasmic tail divided in two domains: the juxtamembrane domain (JMD) which is adjacent to the cadherin transmembrane segment and the C-terminal catenin binding domain (CBD). p120ctn binding to JMD stabilizes classical cadherin. β-catenin binds to Cadherin CBD and α-catenin, which connects the junction to the actin cytoskeleton. Nectin also contains an extracellular region, a transmembrane domain and a cytoplasmic tail, which binds.Afadin linked to actin filaments,.

2) p120 catenin (p120ctn) is a gatekeeper of the stabilization of cadherin-catenin complexes to the cell surface. Under stress conditions, the epithelium is altered. This step is characterized by cell-cell dissociation resulting from an uncoupling between p120ctn and E-cadherin, which stimulates E-cadherin endocytosis and p120ctn and β-catenin translocation into the cytoplasm or the nucleus.

3) Cell-cell dissociation is the initial step of the epithelial to mesenchymal transition (EMT). Mesenchymal cells have a fusiform morphology and interact with each other only through focal points.During this process there is a shift in cadherin expression: epithelial cells express high levels of E-cadherin, whereas mesenchymal cells rather express N-cadherin. Thus, EMT entails invasion and cellular proliferation, two processes implicated in cancerogenesis.

all of which interact with various cadherin–related proteins (Nollet et al. 2000). Several species of classical cadherins are named after the tissue in which they are predominantly expressed, such as E-cadherins (epithelial cadherins), N-cadherins (neural-cadherins), P-cadherins (placenta cadherins), VE-cadherins (vacular endithelial cadherins) (Takeichi, 1988).Thus, cadherins are very diverse in both structure and function, and their mutual interactions influence biological responses in complex and versatile ways. Their roles in suppression versus initiation or progression of multiple tumor types have been discussed in an excellent review fromFrans Van Roy (van Roy 2014).

Mammalian AJ contains classical cadherins (approximately 20 members) that share a common domain organization (for review (Niessen 2007)): they possess an extracellular N-terminal region or ectodomain, a single pass trans-membrane segment and a highly conserved short cytoplasmic tail that contains catenin-binding sites (Boggon et al., 2002). The cytoplasmic tail interacts with β-catenin, which in turn binds α-catenin, allowing an adjustable linkage between the cadherin-catenin complex and the actin cytoskeleton (Horikawa et al., 1999). Adhesion is mediated by the extracellular fragment, whereas the cytoplasmic sequence regulatessignaling, turn-over and modulates actin assembly(Nelson & Nusse, 2004a;Masatoshi Takeichi, 2007).

2.1 Interaction between neighboringcadherins: the pivotal role of Ectodomain

The extracellular domain of E-cadherin principally forms homophilic bonds with E-cadherins on adjacent cells (Gumbiner, 2000; Foty and Steinberg, 2005). The ectodomain is divided into five repetitive domains of approximately 110 amino acids length, called extracellular repeats (EC) domains (Overduin et al. 1995). EC are ranging from the membrane-most distal EC1 domain to the membrane-most proximal EC5 domain. Each subdomain contains a highly conserved calcium-binding sitethat controls the adhesive function of AJ by modifying the ectodomain conformation(Pokutta et al. 1994). In 2010, Hong and colleagues demonstrated that cadherin mutants lacking the cytoplasmic domain are able to driveAJ formation, indicating that the structural determinants of this process reside in the ectodomain(Hong et al. 2010b).

Cell-cell adhesion is a dynamic process where cadherins adjust their binding kinetics in order to resist to mechanical perturbations(Harrison et al. 2011). This process is mediated by cooperative formation of distinct cadherin–cadherin interfaces in *cis*: between cadherins in a parallel orientationon the same cell and in *trans*: between opposing cadherins, on two adjacentcells.Classical cadherin ectodomains form *trans* adhesive homodimers through their membrane-distal EC1 domains, bridging the intermembrane space between opposing cells. Atomic resolution structures of classical cadherin ectodomain and electron micrographs of isolated natural and recombinant E-cadherin extracellular domainsindicate that the extracellular domain of classical cadherins generally has a stable curved structure(Pokutta et al. 1994; Tomschy et al. 1996)(Boggon et al. 2002).

All classical cadherins share a common binding mechanism in which the dimerization is swapping of the amino-terminal β-strand between interacting EC1 domains. Mutational, structural and cellular experiments revealed that this strand swapping is stabilized by three interactions. One interaction is the insertion of conserved tryptophan at position 2(Trp 2) residue into a hydrophobicpocket of the interacting partner([CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]; Boggon et al. 2002; Häussinger et al. 2002; Parisini et al. 2007). The second interaction is the formation of salt bridges between N-terminal amino acid ($NH3^{+}$) and the carboxyl group of Glu 89 residue (Harrison et al. 2005). An additional interaction is hydrogen bonds between Asp1 and Asn27 and between Trp2 and Asp90.In the calcium bound form, ectodomains are rigid and molecules from the opposing plasma membrane have favorable orientation for the *trans* swap (Pokutta et al. 1994; Chitaev et al. 1998). When *trans*-dimer are formed, the flexibility is markedly reduced, which lowers the entropic penalty associated with *cis*-dimer formation (Wu et al. 2011). Micropipette manipulations

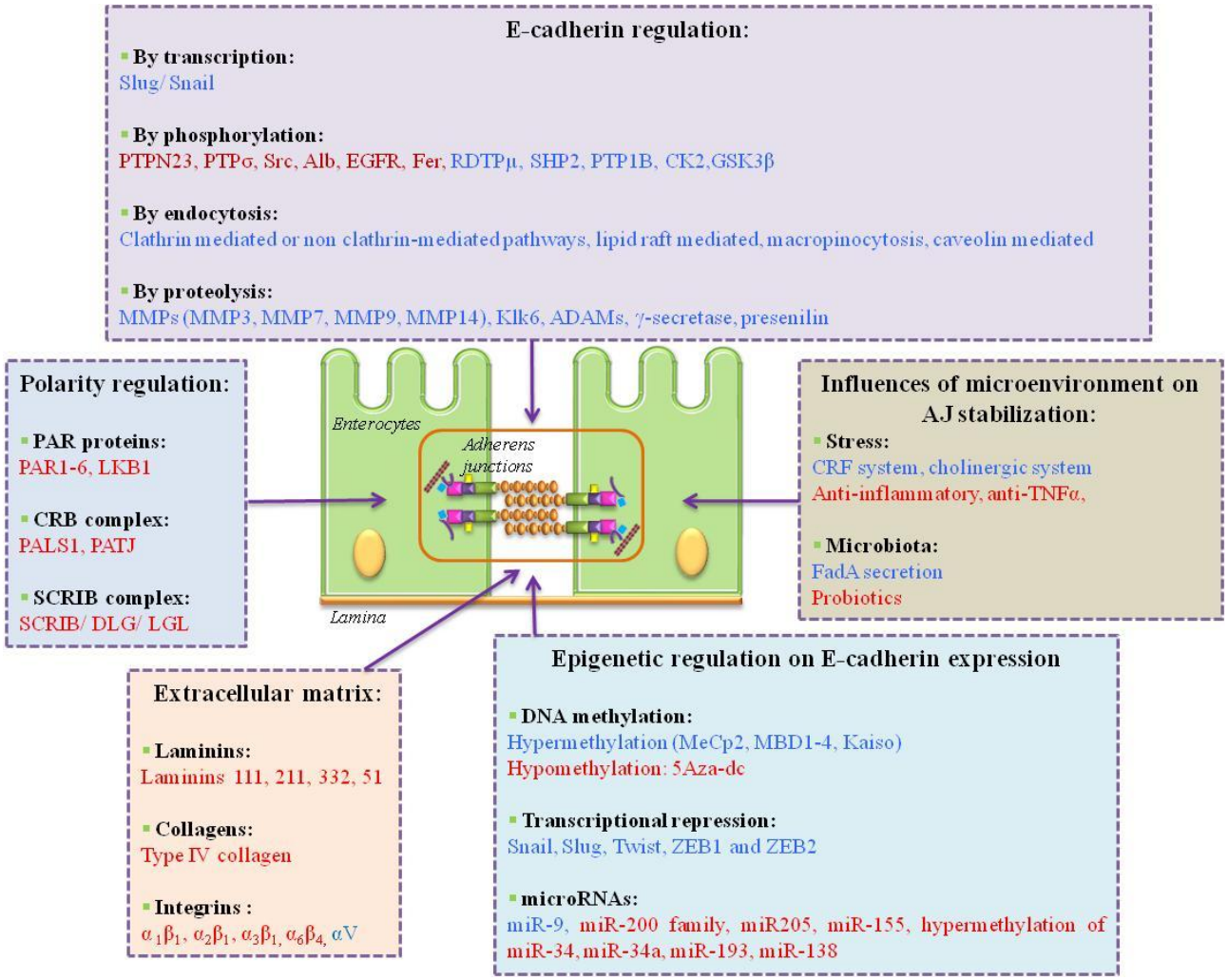


Figure 2: Modulators of epithelial AJ dynamic

Overview of the different processes and actors involved in the regulation of AJ dynamic in epithelial cells. “Positive” regulators that favor the expression of AJ proteins and their stabilization are presented in red. On the opposite, “negative” regulators of AJ are shown in blue.

show that the binding between two opposite cells occurs in two steps: an initial rapid stage inducing *trans*-dimer, a second slower stage ascribed to *cis*-adhesion(Chien et al. 2008).While the *trans*-dimerization is well established, the existence and functional roles of *cis*-dimers are not clearly resolved. Cadherin adhesion is enhanced by lateral assembly as a dimer (*cis*-dimer) on surface cell that interacts with *cis*-dimer on opposite cell to form *trans*-adhesion. X-ray observations of several classical cadherinssuggested that interactions between the apex of EC1 and the base of EC2 and EC3 of neighboring cadherins induce dimerization in a *cis* orientation(Boggon et al. 2002; Harrison et al. 2011). However, nuclear magnetic resonance measurements and single-molecule fluorescence resonance energy transfer experiments could not detect *cis*-dimerization formation (Häussinger et al. 2002; Zhang et al. 2009). Recent theoretical studies predict that *cis*-dimer formation requires prior *trans*-assembly (Wu et al. 2011).

2.2 Interactions with the cytoplasmic domain of E-cadherin

The cytoplasmic domain is not essential for cadherin dimerization duringcell-cell contact but it plays a pivotal role in sensing and transducing adhesion related signal(Hong et al. 2010b; Harrison et al. 2011).The cytoplasmic fragment can be divided into two subdomains: the juxtamembrane domain (JMD), which is adjacent to the cadherin transmembrane segment and the C-terminal binding domain (CBD),each of which has a sequence motif of about 30–35 residues, respectively called CH2 and CH3 (CH, cadherin homology region) (Rimm et al. 1994). The JDM supports many aspects essential for cadherins fuctions including clustering, adhesive strengthening and suppression of cell motility (Chen, Paradies, Fedor-Chaiken, & Brackenbury, 1997 ; Yap 1998). The deletion of the CBD, including CH3, abrogated Ca^{2+}-dependent cell aggregation (Nagafuchi and Takeichi 1988). This region was narrowed down to a core region of 30 amino acids that included up to eight well-conserved Ser residues that were highly phosphorylated and shown to be important for catenin binding and cell-cell adhesion. Interestingly, several experiments indicate that the JMD has both positive and negative functions in cadherin clustering and cell–cell adhesion. The clustering potential of the JMD appears to be activated by the cadherin *trans*-dimerization and is not observed in the absence of *trans*-adhesion (Anastasiadis and Reynolds 2000). Thus, cadherin clustering *in vivo* might be secondary to the formation of adhesive cadherin dimers, and requires the JMD but not the CBD.

These domains interact with various armadillo family proteins:the JMD binds to p120 catenin (p120ctn) and the CBD interacts with β-catenin and plakoglobin(A. H. Huber, Weis, & West, 2001; Ishiyama et al., 2010).

2.2.1β-catenin

About 20 years ago, β-cateninwas independently discovered twice, on the basis of its different functions: structuraland signaling(McCrea et al. 1991). Togeher with its structural as a binging partner of E-cadherin, β-catenin plays a pivotal role as a transcriptional co-activator of Wnt signaling (Behrens et al. 1996)(for review see(Cadigan and Peifer 2009; Clevers and Nusse 2012)).When Wnt signal is absent, the majority of β-catenin is localized in the cortical region as a component of cadherin-based adhesion complex. β-catenin interacts with α-catenin *via* the distal part of its N-terminal domain and binds to the CBD of cadherin throughan armadillo domain. β-catenin can interact with the cytoplasmic domain of all classical cadherin, however the most studied are the consequences of β-catenin binding to E-cadherin. This association occurs early after E-cadherin synthesis, in the endoplasmic reticulum, where it supports the transport of E-cadherin to the membrane(Chen et al. 1999). More detailed roles of cortical, cytoplasmic and nuclear β-catenin roles are discussed in section 3.1.

2.2.2 p120ctn

p120ctn is a member of a subfamily of Armadillo (ARM) repeat containing proteins(Riggleman et al. 1990). ARM domain repeats are found in a large variety of proteins and facilitate protein–protein interactions(Hatzfeld 1999).p120ctn is encoded by the gene *CTNND1*, that consists of 21 exons encoding 968 amino acids (Keirsebilck et al. 1998). Cloning and analysis of *CTNND1*revealed four alternatively spliced exons and four transcriptional start sites at amino acid residues 1, 55, 102 and 324, that can initiate expression of isoforms 1, 2, 3 and 4. Together they can potentially produce 64 different isoforms of p120ctn, named after the transcriptional start site used (1–4), and the alternatively spliced exons they express (A–D)(Keirsebilck et al. 1998; Aho et al. 1999).This variety of isoforms might reflect tissue-or context specific expression. Indeed, isoforms 1 and 3 are the most widely and abundantly found, with isoform 1 beingpreferentially expressed inmotile, mesenchymal-type cells, whereas isoform 3 characterizes epithelial cells. Theisoform 1 contains an N-terminal coiled-coil domain, which is absent from others. A regulatory region harboring most of the tyrosine and serine/threonine phosphorylation sites in p120ctn follows the N-terminal domain (Alemà and Salvatore 2007). The C-terminal tail of p120ctnalso contains several serine/threonine phosphorylation sites as well as the alternatively spliced exon A and exon B.The presence of the alternatively spliced exon C results in the disruption of a nuclear localization signal (NLS), the inhibition of binding to RhoA and decreased endothelial growth factor (EGF)-induced phosphorylation (Mo and Reynolds 1996; Keirsebilck et al. 1998; van Hengel et al. 1999; Thoreson et al. 2000; Keilhack et al. 2000).p120ctn regulates many functions both upstream and downstream of E-cadherin, which are developedin details in more specific section 3.2.

Heterotrimeric G proteins of the G12 subfamily mediate cellular signals leading to events such as cytoskeletal rearrangements, cell proliferation, and oncogenic transformation(Jiang et al. 1993; Buhl et al. 1995; Meigs et al. 2001; Goulimari et al. 2005; Rieken et al. 2006). TheG12 subfamily of G proteins is comprised of the ubiquitously expressed members Gα12 and Gα13, which share 67% amino acid identity (Strathmann and Simon 1991). Several recent studies have revealed direct effector proteins through which G12 subfamily members may transmit signals leading to various cellular responses. In particular, Gα12/13 have been found to interact with the cytoplasmic tail of E- cadherin in a region different from β-catenin and p120ctn, and trigger the release of β-catenin from cadherin complexes, which localizes to the cytoplasm and nucleus where it participates in transcriptional activation, thereby disrupting cadherin-mediated cell-cell adhesion(Meigs et al. 2001; Kaplan et al. 2001; Meigs et al. 2002). Alternatively,the activation of RhoA by G12 subfamily proteins can counteract the p120ctn-mediated inhibition of RhoA. The inhibitory activity of Gα12 on p120ctn-mediated RhoA regulation does not require Gα12 binding to p120ctn while both members of the G12 subfamily can interact with p120ctn in the presence or absence of E-cadherin (Krakstad et al. 2004). In fact, Gα12 binds to a region overlapping with the phosphorylation domain in the N-terminus of p120ctn and Gα12 down-regulates the overall tyrosine phosphorylation on p120ctn, including phosphorylation of residue Y228 induced by Src and EGF(Ardawatia et al. 2011).

2.2.3: α-catenin

α-catenin is a crucial component of AJ: cells devoid of α-catenin do not form intercellular contacts while its expression provokes AJ assembly and favors apico-basal cell polarity establishment(Hirano et al. 1992). Unlike other catenins, α-catenin binds indirectly to cadherins throughthe amino acids 118-149 of β-catenin (Aberle et al. 1996; Huber et al. 2001). α-catenin binds

simultaneously to the β-catenin-cadherin complex and actin either directly or indirectly throughactin-binding-proteins. β-catenin and actin binding to α-cateninis mutually exclusive and the binding site overlaps with α-catenin‟s homodimerization region, thus α-catenin binds to AJ only in its monomeric form to give a β--catenin/ α-catenin heterodimer (Drees et al. 2005). In fact, α-catenin monomer has higher affinity for β--catenin than the homodimer and, on the opposite, actin pelleting experiments showed that α-catenin homodimer has a higher affinity for actin filament than the monomer. One of the direct consequence is that thebinding of α-catenin to AJ complex negatively regulates its activity on actin polymerization (Yamada et al. 2005).

3. Catenin-dependent signaling to and from AJ: roles in intestinal epithelium

Cadherins engaged in AJ can modulate many cellular processes: intercellular adhesion of course, but also epithelial differentiation, cytoskeleton modulationand evencell proliferation through contact inhibition. The majority of these regulations depend on catenins and their associated proteins. The next section summarizes the roles ofβ-catenin and p120ctn on cell adhesion and proliferation as well as on cytoskeleton regulation, and their effect on intestinal epithelium function.

3.1 β-catenin and the Wnt pathway

β-catenin regulates cell-to-cell adhesion and gene transcription through its interactions with cadherins and Wnt signaling. In the AJ, the main function of β-catenin is to provide a link with the cortical actomyosin cytoskeleton through α-catenin (Aberle et al. 1994), Vinculin (le Duc et al. 2010) and Eplin/Lima 2 (Abe and Takeichi 2008).E-cadherin mutants enable to bind β-catenin (mutants with deleted CBD)fail to accumulate at the AJ and are recognized by an ubiquitin ligase, Hakaithat marks E-cadherin for lysosomal degradation.Overall, β-catenin enhances the cadherin adhesion *via* two major mechanisms: 1) by preventing the cadherin degradation and regulating the cadherin trafficking from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane; 2) by increasing the cadherin stability at plasma membrane throughα-catenin recruitment (Miyashita and Ozawa 2007; Troyanovsky et al. 2011). However, the affinity of β-catenin interaction with E-cadherin is constantly controlled: this association is increased upon serine phosphorylation events occurring in the CBD of cadherin, while on the opposite, growth factors (GF) dependent phosphorylation of β-catenin onTyrosine 654 is responsible for the release of β-catenin from the cadherin CBD (Roura et al. 1999; Huber et al. 2001).When non-associated to E-cadherin, β-catenin works as a rheostat and a transducer of cellular environment signaling: under normal conditionsand in the absence of Wnt signaling, cytoplasmic β-catenin is recruited and phosphorylated by the formed by the adenomatous polyposis coli protein with Axin and Glycogen synthase kinase 3 (APC/Axin/GSK3) complex. This phosphorylation favors β-catenin ubiquitination and its degradation by the proteasome (Aberle et al. 1997). Conversely, in condition where the binding of Wnt ligand to its transmembrane receptor Frizzled activates the Wnt pathway, the destruction complex gets inactivated and β-catenin accumulates in the cytoplasm and the nucleus (Behrens et al. 1996). In the nucleus, β-catenin interacts with the T cell factor/ Lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) transcription factors and potentiates the transcriptional activity of the complex (van de Wetering et al. 1997), leading to the expression of proliferation genes such as Myc and cyclin D1 (He et al. 1998; Tetsu and McCormick 1999). Therefore, in this case β-catenin plays a positive role towards cell proliferation.Thus a balance between membranes, cytosolic and nuclear β-catenin exists and exerts a primordial role on epithelial cells function.

In the physiologic intestinal epithelium, cells in the crypt compartment receive a strong Wnt signaland E-cadherin expression is reduced, possibly because of Snail-dependent repression (Batlle et al. 2000) (see section 5). This leads to an accumulation of nuclear β-catenin in the crypt compartment that favors the proliferation of precursor cells (van de Wetering et al. 2002). Later, during epithelial differentiation, when epithelial progenitors migrate from the crypt toward the villi, strengthening of intercellular contacts implicating E-cadherin induces β-catenin sequestration at the cortex, leading to a reduction of the cytoplasmic β-catenin pool that interacts with TCF/LEFthus resulting in a decrease in cell proliferation (Mariadason et al. 2001; Gottardi et al. 2001).

3.2 p120ctn: the multitasking partner

When localized at the AJ, p120ctnis a gatekeeper of AJ formation, stability, turnover, and also provide a connection to the microtubule cytoskeleton. When not associated to E-cadherin, p120ctn is present in the cytoplasm but to date, no mechanism of environmentally controlled cytoplasmic degradation equivalent to APC/Axin/GSK3 complex for β-catenin was described, although calpain-mediated degradation of p120ctn has been showed (Ohno et al. 2007; Wang et al. 2011).However, in another parallel with β-catenin, p120ctn functions in the cytoplasm and in the nucleus multiple pathways.

3.2.1 p120ctn at the junction

At the plasma membrane, the p120ctncentral ARM domain associates with the E- cadherin JMD core region (JDM ^{core}), resulting in stabilization and maturation of the AJ (Daniel & Reynolds, 1995; Thoreson et al., 2000). To better understand how the interaction between p120ctn and JMD modulates the stability of cadherin, Ishiyama and al. elaborated variants of p120ctn to co-crystallize with E-cadherin JMD domain. They showed that the binding of p120ctn to E-cadherin involves electrostatic interactions, hydrogen bonds and salt bridges between the acidic region of the JDM ^{core} and the basic p120ctn region. A second region includes mainly hydrophobic interactions between C-terminal of JMD ^{core} and the N-terminal part of p120ctn (Ishiyama et al. 2010). Several studies showed that a reduction of p120ctn expression (by genetic approaches or an uncoupling between cadherin and p120ctn)provokes the exposition ofE-cadherin dileucine motif (LL 743–744),responsible for cadherin internalization and therefore reduces the amount of cadherin available for cell-cell adhesion. Miranda et*al*., demonstrated that this motif is required for the proper sorting of newly synthetized E-cadherin to the basolateral membrane of polarized epithelial cells (Miranda et al. 2001). However, E-cadherin mutants unable to bind p120ctn are properly targeted to the plasma membrane, suggesting that p120ctn acts as a "cap" on the cadherin cytoplasmic tail to mask an endocytic signal (Nanes et al. 2012).Based on structural evidences, it appears that p120ctn binding physically impedes the interaction of cadherin molecules with E3 ligases. Indeed, the association of the Cbl-like protein Hakai to E-cadherin subsequently ubiquitinilates E-cadherin either at the membrane or rapidly after endocytosis. This process determines whether E-cadherin is recycled to the membrane or targeted for lysosomal degradation(Fujita et al. 2002; Palacios et al. 2005; Hartsock and Nelson 2012).Alternatively, p120ctn can recruit presenilin 1 (PSEN1) to the AJ (Baki et al. 2001; Marambaud et al. 2002; Spasic and Annaert 2008). This protease-mediated cleavage of E-cadherin results in the disassembly of AJs and the release of a C-terminal fragments of E-cadherin in the cytoplasm, that is capable of transporting p120ctn to the nucleus, thus affecting Wnt signaling, as discussed in more detail below (section 2.2.3). An alternative mechanism of AJ degradation is facilitated by NUMB,

which can interact with the C-terminal region of p120ctn resulting in stimulation of clathrin-dependent endocytosis of AJ complex components (Wang and Li; Wang et al. 2009; Sato et al. 2011).

3.2.2 p120ctn and small GTPases

Rho family GTPases such as Rho, Rac, and cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) play important roles in the regulation of cytoskeletal organization and actin dynamics. Their localized activity is required to induce proper cell polarity, migration and AJ formation and maturation (Etienne-Manneville and Hall 2002). Interestingly, p120ctn regulates the activity of these small monomeric GTPases: it directly interacts with and inhibits RhoA, acting as a Rho-GDI (Castaño et al. 2007) while it activates Rac and cdc42 through Vav2, a guanine nucleotide exchangefactor (GEF) for these GTPases (Noren et al. 2000).The initiation of cadherin-mediated adhesion was found to inhibit RhoA activity but to stimulate Rac1 activity(Kovacs et al. 2002), and this activation is dependent on binding of p120ctn to the cadherin (Goodwin et al. 2003). However when p120ctn binds to cadherin, it loses the ability to inhibit RhoA activity (Anastasiadis et al. 2000). Interestingly, Izumi and colleagues found that clathrin-dependent endocytosis of E-cadherin was inhibited by activation of Rac and cdc42 through IQGAP1 and actin filaments, suggesting that p120ctn may regulate indirectly cadherin endocytosis via small GTPases (Izumi et al. 2004). Thus, p120ctn can modulate the dynamic and morphology of the actin cytoskeleton, and for instance, its overexpression in fibroblasts leads to a characteristic "dendritic phenotype", presenting long membranous extensions and filopodias. The direct consequence of this regulation is that p120ctn can affect cell motility depending on the level and the type of cadherin expressed at the plasma membrane(Grosheva et al. 2001; Yanagisawa et al. 2008).

3.2.3 p120ctn and KAISO in the nucleus

In addition to its membrane-related and cytosolic functions, the presence of an NLS and NES sequences, and ARM-domain render p120ctn capable of shuttling in and out of the nucleus (van Hengel et al. 1999; Roczniak-Ferguson and Reynolds 2003; Kelly et al. 2004). Alternatively, p120ctn might travel to the nuclear compartment through its association and subsequent translocation with Gli-similar protein Glis2 (Hosking et al. 2007; Vasanth et al. 2011) or a C- terminal fragment of E-cadherin (Ferber et al. 2008). Thus p120ctn can modulate gene expression through its direct interaction with the transcriptional repressor Kaiso (ZTBT33) and the transcription factors Glis2 (Daniel and Reynolds 1999; Hosking et al. 2007). Kaiso is a member of the POZ-ZF or BTB family of transcription factors that can bind to methylated DNA and/or a specific Kaiso binding sequence (TCCTGCNA) (Prokhortchouk et al. 2001; Daniel et al. 2002; Daniel 2007; Donaldson et al. 2012). The fixation of Kaiso to its target genes represses their transcription, and p120ctn association to Kaiso releases this repression (Daniel et al. 2002). Interestingly, some of these genes, such as the ones encoding Wnt11, Cyclin D1 and matrilysin are also targets activated by the β-catenin /TCF/LEF complex, which have been linked to noncanonical and canonical Wnt-dependent developmental processes (Daniel et al. 2002; Kim et al. 2004; Park et al. 2006; Hong et al. 2010a). Therefore by interacting with Kaiso, p120ctn potentiates the proliferative effect of β-catenin, highlighting the convergence of the two catenins-dependent pathways in the regulation of cell proliferation (Spring et al. 2005; Park et al. 2005; Park et al. 2006). Nuclear Kaiso might also indirectly inhibit canonical Wnt signaling by sequestering β−catenin and TCF/LEF transcription factors that act downstream from canonical Wnt signaling (Ruzov et al. 2009; Del Valle-Pérez et al. 2011). Overall, it appears that p120ctn is an important regulator of Kaiso-dependent repression of transcription. Furthermore, in a

similar manner to β-catenin, p120ctn can control post-translational processes in the cytosol and regulate transcriptional processes in the nucleus.

3.2.4 p120ctn and microtubules

Lastly, p120ctn influences cell cycle by interacting with microtubules and centrosomes during mitosis(Franz and Ridley 2004; Yanagisawa et al. 2004; Chartier et al. 2007). These interactions have several consequences: i) they can support p120ctn trafficking along microtubules through kinesin; ii) they favor microtubules bundling and stability (Ichii and Takeichi 2007) and ii) they can regulate proper centrosome duplication, possibly through the stabilization of Cyclin E levels (Chartier et al. 2007; Jiang et al. 2012). p120ctn also interacts with CLASP proteins, microtubules plus-end binding proteins, that allow the association and the stabilization of microtubules at the AJ, which seems to play a role in the determination of epidermal cells progenitors (Shahbazi et al. 2013).

4.Dynamic regulation of Adherens Junctions

4.1 Regulation by polarity proteins

The intestinal epithelium supports the two main functions of the intestine: allow optimal nutriment absorption and act as a barrier toward external medium. Both functions important point of reference as well as a docking plateform for signalization enabling enterocyte polarization. Indeed determination of AJ location on the baso-apical axis is an important step in epithelial differentiation and allows the strong maintenance of epithelial polarity, with adhesion complexes being at the boarder between basal and apical domains. The next section will discuss the interconnections between AJ components and polarity establishment, with a focus on intestinal epithelium.

4.1.1 PAR proteins

Intrinsic polarity regulators were well described in the last 20 years thanks to genetic studies in model organisms such as the fruit fly*D. melanogaster* and the nematode *C. elegans*. Originally identified in *C. elegans*, the PAR protein family (for PARtitionning defective mutants) comprises seven proteins (PAR-1 to 6 and αPKC), each of them being involved in intrinsic antero-posterior polarity establishment and/or maintenance in early *C. elegans* embryo(Kemphues et al. 1988). With the exception of PAR-2, these proteins have homologues in mammals and have an effect on epithelial baso-apical polarity, acting to maintain the basolateral and apical domains depending on their localization. In mammalian epithelial cells, PAR proteins function by a mutual exclusion mechanism, where PAR-1 (or MARK, for Microtubule Affinity Regulating Kinase, is localized at the basolateral domain and maintains the integrity of this domain by excluding the apical protein PAR-3 by phosphorylation(Drewes et al. 1997; Böhm et al. 1997). Phosphorylated PAR-3 is then trapped in the cytoplasm by PAR-5 (14-3-3 in mammals) so that it is excluded from the basolateral domain (Hurd et al. 2003). In turn, the kinase αPKC, associated with the apical proteins PAR-3 and PAR-6 phosphorylates PAR-1 to exclude it from the apical cortex (Hurov et al. 2004; Suzuki et al. 2004). PAR-6 also interacts with the small GTPase cdc42 in the apical domain (Lin et al. 2000). Such mutual inhibition mechanism allows robust polarity establishment and maintenance. During the early stages of intercellular adhesion formation, the interaction of nectin and afadin with PAR-3 allows the subsequent assembly of AJand TJ(Ooshio et al. 2007). Then PAR-3 exclusion is required to separate TJ components from AJ components, this is allowed by PAR-3 binding to a Rac1 GEF, TIAM-1 and

the subsequent activation of Rac1 GTPase (Chen and Macara 2005). Then apical PAR-3 is kept excluded from tight junction by αPKC phosphorylation (Horikoshi et al. 2009). *Invitro*, the inhibition of PAR-1, αPKC or PAR-3 affects the capacity of MDCK epithelial cells to generate a proper apical lumen (Cohen et al. 2004; Hao et al. 2010).

4.1.2 CRUMB and SCRIB complexes

While PAR proteins are general regulators of cell polarity and act both to polarize epithelial cells, migrating cells and the cells undergoing asymmetric divisions, some protein complexes regulate polarity more specifically in epithelia. These proteins consist of an apical complex formed by the transmembrane protein CRUMB and its cytosolic interactors PALS1 and PATJ, and a basolateral complex composed of the cytoplasmic proteins SCRIB, Disc Large (DLG) and LGL (for review, see (Martin-Belmonte and Perez-Moreno 2012). Originally identified in *D. melanogaster*, they modulate apical and basolateral domains identity. For instance, overexpression of CRUMB increases the size of the apical domain (Wodarz et al. 1995). The complexes are closely associated to TJ but also to AJ, and it was shown that depleting PALS1 results in the blocking of E-cadherin transport to the membrane (Wang et al. 2007). The basal SCRIB/DLG/LGL complex functions by inhibiting the expansion of the apical domain and it was proposed to do so by competing with PAR3 for the binding to PAR-6/αPKC (Yamanaka et al. 2003). Interestingly, SCRIB localization at the intercellular junctions depends on E-cadherin (Navarro et al. 2005) and its depletion disrupts E-cadherin-dependent contacts (Qin et al. 2005). Consistently, SCRIB and its associated partners are found mislocalized or down-regulated in many cancers including colon cancers (Schimanski et al. 2005; Gardiol et al. 2006).

Mammalian epithelial cells, including intestinal epithelial cells (IEC), use partially redundant and therefore strong signaling pathways to ensure proper polarity establishment. In the first steps of intercellular contact formation, tight and adherens junctions depend on cell polarity signaling to be localized at the apical/lateral side of epithelial cells. Then, in a second step of maintenance of polarity, these junctions serve as docking plateform for the different complexes and favor a positive feedback loop to amplify and strengthen epithelial polarity.

4.2 Regulation by the extracellular matrix

There are two major types of cell adhesion: the cell-matrix and the intercellular adhesion. Epithelial cells adhere to a specialized extracellular matrix (ECM) called basal lamina through protein complexes called hemidesmosomes and focal adhesions, localized at the basal pole of the differentiated epithelial cells. These complexes mainly involve the transmembrane adhesion receptors integrins, associated to diverse structural and regulatory intracellular adaptators.The capacity of these adhesion systems to modulate intracellular signaling in response to surrounding environmental conditions combined with their ability to modulate adhesion strength during epithelial differentiation support the notion that they are important for intestinal epithelium functions(Carroll et al. 1988; Kedinger et al. 1998; Beaulieu 1999; Stutzmann et al. 2000). In the next section, we will present the different actors of cell to matrix adhesion in IEC and their connection with the AJ proteins.

Basal lamina is the frontier between epithelial cells and conjunctive tissue. It is composed of macromolecules being synthetized both by epithelial cells themselves and the conjunctive tissue. These macromolecules include collagens, laminins, fibronectines and proteoglycans associated in a multidimensional network (Simon-Assmann et al. 1995; Aumailley and Krieg 1996). In intestinal epithelium basal lamina, the principal component is type IV collagen, that builds a strong foundation for other macromolecules and can interact with epithelial cells through α1β1, α2β1 □ □ □α3β1

integrins (Vandenberg et al. 1991; Gout et al. 2001a). Type VII collagen was also observed in adult human small intestine (Lohi et al. 1996; Leivo et al. 1996). Intestinal ECM is also enriched in laminins, glycoproteins made of three chains, α, β and γ interacting through disulfide bounds (Burgeson et al. 1994; Mercurio 1995). From the 19laminin isoforms identified to date (Durbeej 2010), 4 are expressed in the intestinal epithelium: laminins 111, 211, 332 and 511(Teller and Beaulieu 2004; Turck et al. 2005). Depending on the isoforms, laminins also interact with integrin receptors at the basal pole of the epithelial cells. Other MEC components are present in a more broad range of basal lamina, such as fibronectin, secreted by fibroblasts from the conjunctive environment, interacting on a concensus RGD motif of integrins. Long proteoglycans as perlecan are part of the ECM too, allowing the establishment of a hydrophilic gel prone to molecules diffusions and protein-proteininteractions.Interestingly, immunohistochemistry experiments have shown that the repartition of basal lamina components along the crypt-villus axis is not uniform. Indeed, as it is known that laminin isoforms change during embryonic development (Simo et al. 1991; Simon-Assmann et al. 1995), there is also a spatial variation of these isoforms in adult crypts. Laminins 111 and 211are essentially located in the crypts while laminins 332 and 511are enriched in villi (Basora et al. 1999). Therefore, laminin 332 forms a gradient from the base of villi to the apex, correlating with enterocytic differentiation. Such specific repartition suggests that the ECM, depending on its composition, can activate different signalization pathways that regulate proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells (Turck et al. 2005).

ECM signals to epithelial cells through integrins, whose functions are to anchor cells to the MEC, to stabilize the cytoskeleton and allow a bi-directional signaling. Each integrin heterodimer can recognize many targets proteins in the ECM with different affinities; it is thus possible to classify sub-family depending on their β subunits, the α subunit providing specificity towards ligand. β1 integrins are the most represented, both in term of heterodimer number and in their tissue distribution. They recognize most of ECM proteins: fibronectin, vitronectin as well as laminin and collagens. In the intestinal epithelium, the laminin-specific α7β1 integrin but also α2β1 and α3β1 are expressed. Surprisingly, however, conditional deletion of β1 integrin in mouse does not modify adherence capacities to ECM, but induces an hyperproliferation due to a misregulation of the Hedgehog pathway (Jones et al. 2006). These results suggest that contrarily to other tissues such as epidermis or mammary gland epithelium, β1 integrins have a preferential role in signal transduction than in adhesion in the intestinal epithelium. Thus, other heterodimers regulate at least partially IEC adhesion to the ECM. This is the case of α6β4, found in complexes called hemidesmosomes, allowing the anchorage to laminin 332(Giancotti 1996). Consistently, deletion of β4 subunit cytoplasmic domain induces adhesion and proliferative defects in mice (Murgia et al. 1998). Work from JF Beaulieu also revealed the presence in the intestine of a variant called β4Actd- devoid of its carboxy-terminal extremity (Basora et al. 1999). This variant can interact with the β6 subunit but the association to laminin 332 is lost. It is expressed more predominantly in the crypts while the untruncated form is expressed in the villi, when cells are fully differentiated, concomitantly with the expression profile of laminins. Such a precise regulation of cell to ECM interaction during the proliferation and differentiation process of IEC suggest a close relationship between integrin signaling and subsequent differentiation programs implicating intercellular junctions proteins as E-cadherin or the catenins.

Once engaged to their ECM substrate, integrins transduce an intracellular signal through kinases such as the focal adhesion kinase (FAK) or the integrin linked kinase (ILK) (for review, see (Gilcrease 2007)), some of which have a direct impact on intercellular adhesions. For instance, integrin β1-dependent activation of FAK in colon cancer cells leads to Src activation and E-cadherin delocalization (Avizienyte et al. 2002), a process that seems to depend on the control of peripheral phospho-myosin by Src (Avizienyte et al. 2004; Martinez-Rico et al. 2010). The exact signaling

pathways are still not totally clear and seem to be dependent on the cell type and tissue investigated. For instance, it was proposed that TGF-β signaling through the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and the phosphatase and tensin homolog (PTEN) can down-regulate E-cadherin-dependent intercellular contacts in pancreatic carcinoma cells (Vogelmann et al. 2005) while another study indicates that FAK activation upon TGF-β treatment induces E-cadherin expression in colon carcinoma cells (Wang et al. 2004). However in the latter publication, the localization of overexpressed E-cadherin is not discussed and it could be trapped in cytoplasmic vesicles.More recently, the α3β1 integrin has also been shown to regulate the β-catenin pool through interactions with E-cadherin (Kim et al. 2009). Immune fluorescent studies demonstrated that α3β1 integrin co-localizes with E-cadherin. Biochemical studies in alveolar epithelial cells also have demonstrated that α3β1 integrin physically associates with E-cadherin and the TGF-β receptor. This tri-molecular complex of α3β1 integrin, E-cadherin and the TGF-β receptor results in the tyrosine phosphorylation of β-catenin at position Y654, which subsequently associates with Smad2 (a TGF-β signaling molecule) and then translocates to the nucleus where it can regulate transcription.

This apparently negative effect of integrin-based adhesion on AJ is however balanced by a stabilizing effect of α6β4 activation. Indeed, both in keratinocytes and in human colon carcinoma cells, laminin 332 signals through□ □ □ □and small GTPases (cdc42 and Rac1b respectively) to stabilize AJ(Hintermann et al. 2005; Chartier et al. 2006). For instance, it was shown that αV integrin, E-cadherin and IGF-1R are able to interact in human colon carcinoma cell lines (Canonici et al. 2008). In this context, the binding of IGF1 to IGF1-R disrupts the complex and favors the relocation of αV integrin to focal contacts, thus favoring migration.

As IEC differentiate and migrate toward the apex of villi, they secrete their own ECM proteins and model an ECM gradient for which they adapt their integrin receptors (Gout et al. 2001b). The crosstalk between integrin and cadherin signaling described above therefore allow differentiating cells to sense their position on the crypt-villus axis and adapt their intercellular contacts and thus their degree of differentiation consequently.

4.3 Roles of Nectins

Nectins, which were originally identified as virus receptors, are another family of cell-cell adhesion molecule (CAM) (Takai et al. 2008a; Takai et al. 2008b). They are Ca^{2+}-independent immunoglobulin-like cell adhesion molecules and the nectin family comprises four members, nectin-1 to nectin-4. Nectins are able to interact in *trans* both homophilically and heterophilically, with heterophilic trans-interactions that are much stronger than their homophilic *trans*-interactions. Compared with the stronger *trans*-interaction between E-cadherin molecules, which can facilitate long-term cell–cell adhesion, the weak *trans*-interaction between nectins is more adapted to the formation of transient cell–cell adhesions with a fast turnover.Studies performed in cultured cell lines reveal that nectins initiate the formation of AJ before that cadherins start to form cell–cell adhesions (Takai et al. 2003).Once the initial cell-cell contacts are formed between two neighbouring cells by nectins, cadherins are recruited atthese contact sites, resulting in the formation of strong cell-cell adhesion. The nectin and cadherin systems are then physically associated to establish AJ. Many potential physical links between the nectin–cadherin adhesion systems have been identified; the most direct one being those between afadin and α-catenin or p120ctn (Hoshino et al. 2005). In fact disruption of afadin by knockout or knockdown techniques inhibits the formation of E-cadherin-based AJ(Ikeda et al. 1999; Ooshio et al. 2007).

Either cadherin or nectin engagement can control the activity of the Rho family GTPases, which is a crucial regulator of actin dynamics. Activated forms of these GTPases affect cadherin activity and junction stability suggesting a close reciprocal relationship(Braga and Yap 2005). One model suggests that initial engagement of cells occurs via nectins-mediated activation of Rac and cdc42, which then stimulate the formation of lamellipodial protrusions and cadherin binding (Irie et al. 2004). In addition, Rho GTPases may regulate actomyosin contractions, an important process for junctional rearrangements during morphogenetic movements (Bertet et al. 2004). Local regulation of small GTPase activity is most likely mediated by the recruitment of Rho family GTPase-specific GEFsand GTPase-activating proteins to AJ, several of which interact with core components. AJ may regulate Rho small GTPases via their upstream regulators, the Rap small GTPases. Indeed, RapGEFs directly interact with E-cadherin and engagement of E-cadherin activates Rap. Also, Afadin is an effector of Rap activity, suggesting the possibility of a positive loop reinforcing intercellular adhesion (reviewed in (Kooistra et al. 2007)).

4.4 The dynamic actin cytoskeleton

While much research is focused on identifying the molecular links that bridge the core cadherin-catenin complex to the actin cytoskeleton, less attention is directed toward understanding how actin is initially assembled and organized at AJ. However understanding junctional actin assembly is of importance asit is constantly turning overto maintain AJ steady state (Yamada et al. 2005). Indeed, new actin assembly must accompany the formation of new cadherin contacts that occurs during morphogenetic cell movements and dynamic actin networks can play a key role when cadherin is co-opted during disease, such as during inflammation and cancer.Excellent reviews from the Yap Lab‟s highlight the diverse and dynamic cytoskeletons that contribute to cadherin function and describe how cadherins cooperate with multiple dynamic cytoskeletal networks at AJ (Brieher and Yap 2013; Michael and Yap 2013).Actin dynamics at intercellular adhesive contact sites are very different to those of the cadherin complex, suggesting the absence of a stable interaction. Regardless, both genetic and cell biological data strongly indicate that regulation of actin polymerization does take place at or in close vicinity of the AJ. This is at least partially dependent on α-catenin (reviewed in (Gates and Peifer 2005; Scott and Yap 2006)). In nascent adhesions, α-cateninis presumed to be primarily bound to cadherin, but as the density of cadherin rises over a certain threshold, a subset of α-catenin can dimerize and bind to F-actin in a way that inhibits Arp2/3 from binding (Drees et al. 2005; Benjamin et al. 2010), thus promoting the shift from a protrusive activity to contractility.

Cadherin ligation and clustering is a sequential process that needs the small GTPases Rac1 and cdc42, which promote lamellipodial and filopodial protrusions (Kim et al. 2000b; Kovacs et al. 2002). These protrusions help to increase the contact area with the neighbouring cell and thus positively feedback on cadherin ligation and clustering. Following the recruitment of RacGAPs and RhoGEFs (Ratheesh et al. 2012; Elbediwy et al. 2012), there appears to be a switch from Rac1 and cdc42 to RhoA activity (Yamada and Nelson 2007). Such aRho-Rac antagonism observed during AJ assembly could be mediated by the activation of the p190RhoGAP. Indeed, Rac1 activity causes translocation of p190RhoGAP to AJ, where it couples to cadherin complex via p120ctn and induces a local inhibition of Rho (Wildenberg et al. 2006). In IEC this interaction mainly occurs in lipid raft since we found that p190RhoGAP is recruited in these sites together with E-cadherin and p120ctn and that Rac1 is necessary for this step(Chartier et al. 2011). As the protrusive activity subsides, RhoA activates the formin mDia1 and Rho Kinase (RhoK), whose joint activities lead to the formation of contractile actomyosin bundles (Watanabe et al. 1999; Smutny et al. 2010). Additionally, Myosin II that concentrates with cadherins in AJ of epithelial cells participates in actin contractility (Bertet et al. 2004; Shewan et al. 2005; Yamada and Nelson 2007; Smutny et al. 2010; Gomez et al. 2011).There is

also emerging evidence that formins and Arp2/3 may cooperate at AJ (Block et al. 2012; Blanchoin and Michelot 2012). The following model has been proposed: Arp2/3-mediated actin nucleation reactions and actin branching activity tend to build highly dynamic, protrusive actin structures such as lamellipodia while formin-dependent linear actin filament polymerization, important for fillopodia formation, tends to be associated with contractile actin arrays (Watanabe et al. 1999; Kobielak et al. 2004). Then, the physical tension generated locally appears to recruit additional actin polymerization factors or actin binding proteins such as vinculin, spectrin, cortactin, zyxin, Ena Ena/Vasp, Wave, and Wasp; theses molecules, which can associate with AJ may be responsible for local regulatory activity (reviewed (Gates and Peifer 2005; Scott and Yap 2006; Zaidel-Bar 2013)).N-WASP and WAVElocalize to AJand may activate Arp2/3 to trigger actin assembly(Ivanov et al. 2005; Yamazaki et al. 2007; Campellone and Welch 2010; Kovacs et al. 2011). In addition, the Arp2/3 complex tightly associates with cadherin-enriched membranes, but it largely remains inactive unlessα-actinin also binds to the membrane (Tang and Brieher 2012).In the contractile phase, α-catenin that remains bound to cadherin may expose a cryptic binding site for vinculin that reinforce the link between cadherin and F-actin (Yonemura et al. 2010; le Duc et al. 2010) Other proteins, such as myosin VI and eplin must be specifically recruited to AJ under tension, facilitating a positive feedback between contractility and maturation of AJ (Maddugoda et al. 2007; Taguchi et al. 2011).

4.5 Transcriptional regulation

Zinc finger proteins of the Slug/Snail family are repressors of E-cadherin gene transcription(Cano et al. 2000b; Conacci-sorrell et al. 2003), and their expression is activated by signaling from the fibroblast growth factor FGF-R type I or TGF-βand ErbB1 and ErbB2 (Ciruna and Rossant 2001; Chem et al. 2003; Conacci-sorrell et al. 2003). Slug/Snail expression results in the loss of cell-cell adhesion and increased cell migration. In parallel, Wnt signaling also regulates E-cadherin expression regardless of or synergistically with Slug/Snail (Chem et al. 2003). Thus, the repression of cadherin expression by Slug/Snail or TCF/β□ catenin complex reduces cell-cell adhesion, and works to amplify and/or sustain Wnt signaling. In the nucleus, TGF-β signaling and its downstream effectors SMAD, also coordinate β-catenin-mediated activation of specific gene transcription. Genes activated by Wnt signaling alone, or by both TGF-β and Wnt, are different (Riese et al. 1997; Nishita et al. 2000). Together, these results show that a variety of GF receptor pathways intersect with the Wnt pathway by regulating the availability of signaling β-catenin, either by disrupting the cadherin-catenin complex or by repressing cadherin expression.

4.6 Regulation by phosphorylation

Junction dynamics are regulated by rapid andtransient shifts in protein phosphorylation or dephosphorylation under the control of specific kinases and phosphatases(for review (Bertocchi et al. 2012) (Figures 2 and 3). This process is directly implicated in the regulation of cadherin adhesiveness and functions. So far, twelve serine/threonine kinases (S/T)and nine tyrosinekinases and one S/T and twelve tyrosinephosphatases have been implicated in regulating phospho-residuesof AJ proteins. They are all cytoplasmic and the exact mechanism of their recruitment into AJ is largely unknown.If most likely every kinase and phosphatase can recognize at least one docking site within the AJ, it is not currently known which are permanent residents of AJ and which are transient components. The following section will sum up the key phosphatases and kinases implicated in AJ regulation.

4.6.1 Receptors with kinase activity

Receptor tyrosine kinases are commonly activated by an external ligand, such as a GF or cytokines that induce dimerization, *cis*-phosphorylation or autophosphorylation and subsequent activation of the catalytic domain(Hubbard and Till 2000; Stoker 2005).Cortical or cytoplasmic S/T kinases can be activated by the binding of Rho GTPases, for instanceROCK1 is activated by RhoA and PAK1 is activated by Rac1 and cdc42 (Fujisawa et al. 1996; Lu and Mayer 1999). S/T kinases are also regulated by tyrosine phosphorylation and tyrosine kinases and phosphatases are themselves regulated by S/T phosphorylation, in a complex feedback network. Cadherin ligation and clustering may act as an activation signal for some kinases. Most notably, Src and Fer were shown to be recruited to the membrane upon cadherin binding and EGFR signaling was shown to be stimulated by AJ formation independently of EGF ligand (El Sayegh et al. 2005; Joo et al. 2008; Zandy and Pendergast 2008). Furthermore, cadherin clustering has been found to induce indirectly the activation of RhoGTPases,which in turn could activate S/T kinases(Watanabe et al. 2009).

The structural integrity and the functionality of the cadherin-catenin complex itselfare regulated by many different kinases. The numerous kinases involved and the complexity of their networks makes it difficult to identify a global effect of phosphorylation on AJ. For instance, experiments using different phosphatase inhibitors leaded to the conclusion that phosphorylation is a negative regulator of AJ. Indeed these inhibitors induce a dramatic increase in phospho-tyrosine signals at AJ, followed by the disassembly of AJ (Volberg et al. 1992; Serres et al. 1997). Consistent with the notion that excessive tyrosine phosphorylation causes AJ disassembly, cells expressing constitutively active Src kinase lost intercellular contacts, and inhibition of tyrosine kinase activity by the drug tyrphostin was able to restore AJ in the Src-transformed cells (Volberg et al. 1992).On the opposite, more recent experiments based on loss of function of specific kinases are in favor of a positive role of phosphorylation in AJ assembly. For example, Src and Fyn were found to be essential for the formation of AJ in mouse keratinocytes (Calautti et al. 1998). Src activity is important for the recruitment of PI3K to AJ and promotes the expansion of nascent cadherin-adhesive contacts (Pang et al. 2005). Along the same lines, Abl1 tyrosine kinase activity was shown to be important for the maintenance of AJ in epithelial cells, and S/T phosphorylation of E-cadherin by protein kinase D1 (PRKD1) was found to be associated with increased cellular adhesion and decreased cellular motility in prostate cancer (Jaggi et al. 2005; Zandy et al. 2007).

Concerning E-cadherin, phosphorylation of various S/T sites was described to increase its binding activity towards β-catenin. This is the case of phosphorylation of residues Ser^{684}, Ser^{686} and Ser^{692} by CK2 and GSK3βkinases or residues Ser^{840}, Ser^{851} and Ser^{853} in the C-terminus of human E-cadherin by CSNK1E or PRKD1kinases. In contrast, phosphorylation of Ser^{846}inhibits this interaction (Lilien et al. 2002; Dupre-Crochet et al. 2007). Phosphorylation by Src of three tyrosines in position 753–755 on human E-cadherin creates a docking site for the E3-ligase Hakai, which leads to internalization of E-cadherin facilitating disassembly of the AJ (Fujita et al. 2002; Pece and Gutkind 2002). Catenins are also regulated by phosphorylation. For instance, phosphorylation of β-catenin at Tyr^{489} or Tyr^{654} disrupts binding to cadherin, and at Tyr^{142} disrupts binding to *α*-catenin (Hellberg et al. 2002). Src phosphorylates β-catenin at Tyr^{654}, Abl at Tyr^{489}, EGFFR at $Tyr^{654}$and Fer at Tyr^{142}(Ohsugi et al. 1999; Nawroth et al. 2002; Grazia Lampugnani et al. 2003). The subcellular distribution of nonjunctional β-catenin also depends onGSK3 and Casein Kinase I phosphorylations in the "destruction complex" (Nelson and Nusse 2004). Finally, p120ctn is regulated by phosphorylation too. Eight tyrosine residues in the N-terminus of p120ctn can be phosphorylated by Src (Mariner et al. 2001). Upon phosphorylation, these sites serve as docking sites for proteins carrying SH2 domains, such as the tyrosine phosphatase SHP-1 (Keilhack et al. 2000).Under certain conditions tyrosine phosphorylation of p120ctn was shown to increase its affinity to cadherin, but this does not seem to be a general rule (reviewed in (Alemà and Salvatore 2007)).

In conclusion, the effect phosphorylation on AJ dynamics has to be examined residue-by-residue since some phosphorylation events lead to the switching "on" of a protein or interaction whereas other, even on the same protein, serve to switch it "off".

4.6.2 Phosphatase regulation

Phosphatases are categorized into two major classes, protein tyrosine phosphatases (PTPs) and protein serine/threonine phosphatases (PSPs).Receptor tyrosine phosphatases may be activated by homophilic association with their counterparts on neighboring cells (Zondag and Moolenaar 1997), as well as by tyrosine phosphorylation (Dadke et al. 2001). Several S/T kinases implicated at cell-cell junctions are activated byPTPs (PTPμ, PTP1B, PTB-PEST and others) after removing inhibitory phosphates (for review (Alonso et al. 2004; Sallee et al. 2006)).The effects of the principalphosphatases on AJ are summarized on table1.

PP2A:PP2A appears to play an important role in the dynamicof AJ and TJ assembly. Studies in MDCK cells showed that sequestration of PP2A in AJ due tohypoglycosylation of E-cadherin reduces the binding of PP2A to TJ proteins as ZO-1 and claudin-1and thus favorstheirphosphorylation on Ser residues(Nita-Lazar et al. 2010).

SHP2: The Src homology-2 (SH2) domain-containing phosphatases (SHPs) comprise a sub-family of non-receptor protein-tyrosine phosphatases with two human members, SHP1 (encoded by *PTPN6*) and SHP2 (encoded by *PTPN11*).SHP2 is composed of two SH2 domains (N-SH2, C-SH2), a PTP domain, a C-terminal tail with tyrosine phosphorylation sites (Y542 and Y580) and a proline-rich motif(Chan, Kalaitzidis, & Neel, 2008).Its role inthe regulation of junctional complexes and barrier function is most established in endothelial cells where it is a key regulator of VE-cadherin(Brady-Kalnay et al. 1998). Numerous studies support a link between increased protein tyrosine phosphorylation and vascular permeability. The model is that SHP2 associates with β-catenin in VE-cadherin complexes. When SHP2 dissociatesfrom the complex, β-catenin, γ-catenin and p120ctn phosphorylation increase impairing their association with α-catenin and thus leading to cell junction disassembly and intercellular gap(Tsukatani et al. 1997; Ozawa and Kemler 1998; Ukropec et al. 2000).SHP2 inhibition in pulmonary endothelial cells attenuates the phosphorylation-dependent activity of p190RhoGAPandinduces a concomitant increase in RhoA activation(Grinnell et al. 2010). Therefore, SHP2 appears to play a major role in supporting basal pulmonary endothelial AJ complex integrity and barrier function by coordinating the tyrosine phosphorylation levels of VE-cadherin, β-catenin, as well as p190RhoGAP and the activity of RhoA.

PTP1B:Encoded by the *PTPN1* gene, the non-receptor protein tyrosine phosphatase PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) contains an N-terminal PTP domain, followed by two tandem proline-rich motifs that may allow interaction with SH3 domain-containing proteins. PTP1B contains a C-terminal hydrophobic domain that targets the enzyme to its intracellular location on the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum. PTP1B regulation of junctional proteins wasinitially identified in studies on N-cadherin in neural cells (Balsamo et al. 1996).PTP1B wasalso shown to play an important role in the regulation of AJ in the colon cell line Caco-2 where it regulates cadherin-based adhesion by binding directly to the cadherin cytoplasmic tail and dephosphorylating β-catenin at Tyr^{654}(Danilkovitch-Miagkova et al. 2001). Phosphorylation of PTP1B at $Tyr^{152}$by the tyrosine kinase Fer is required for the interaction with cadherin (Grazia Lampugnani et al. 2003). Indeed, Fer binding to120ctn promotesthe interaction between PTP1B andcadherin and favors the subsequent dephosphorylation of β-catenin at Tyr^{654}.

PTB-PEST:Encoded by the *PTPN12* gene,PTP-PEST is a 88kDa cytosolic PTP belonging to the PEST-domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) subfamily of non-receptor PTPases. PTP-PEST functions as a suppressor of colonic carcinoma epithelial cell motility by controlling Rho GTPase

activity and the assembly of AJ. In the KM12C colonic epithelial cell line, PTP-PEST localizes to AJand its knockdown caused a disruption of cell-cell contacts due to a defect in AJ assembly, but with no effect on E-cadherin expression(Espejo et al. 2010)**.**

RDTPμ*:* Receptor protein tyrosine phosphatase mu (RPTPμ) is a member of the type IIB receptor protein tyrosine phosphatases (RPTPs). This sub-family of RPTPs can be considered as bi-functional cell surface molecules since their ectodomains mediate stable homophilic cell-adhesive interactions, whereas their intracellular catalytic regions can modulate the phosphorylation state of cadherin complexes. RPTPμ interacts with the scaffolding protein RACK1 (receptor for activated protein C kinase)(Mourton et al. 2001)**.** RPTPμ can interact with several members of the cadherin family of cell-adhesion molecules (N, E, R and VE cadherins)(Brady-Kalnay et al. 1998). Functionally, it is thought that such an interaction localizes the phosphatase activity of RPTPμ near the cadherin–catenin complexes, maintaining them in a dephosphorylated state and thus stabilizing the intercellular contacts. Sui et al. showed that RPTPμ can bind directly to VE-cadherin and that overexpression of wild-type RPTPμ decreased tyrosine phosphorylation of VE-cadherin(Sui et al. 2005)

PTPζ*:* PTPsigma (PTPζ) belongs to the type IIa subfamily of RPTPs that includes the phosphatases LAR, PTPζ, and PTPδ(Chagnon et al. 2004; Tonks 2006)**.** The extracellular region of PTPζ comprises three immunoglobulin-like domains and four to nine fibronectin type III domains(Pulido et al. 1995)**.** This region has structural similarity to cell adhesion molecules. A role for PTPζ in cell junction regulation wasidentified by Murchie and colleagues who showed that mice lacking the gene encoding PTPζdevelop mild colitis(Murchie et al. 2014). PTPζ is a positive regulator of intestinal epithelial barrier, which mediates its effects by modulating epithelial cell adhesion through targeting of apical junction complex-associated proteins (including ezrin), a process impaired in IBD.The AJ proteins, E-cadherin and β-catenin are substrates for PTPζ and E-cadherin is hyper-phosphorylated on tyrosine in the colons of the *PtprS*-KO mice relative to wild-type. Phosphorylation of E-cadherin leads to its cellular redistribution away from the AJ and cell dissociation(Wagner et al. 1996; Rioux et al. 2000).

PTPN23*:* PTPN23directly induces E-cadherin internalization and is associated with increased invasion. Src, E-cadherin and β-catenin appear to be direct substrates of PTPN23. An increase inSrc activity with the subsequent loss of PTPN23 is responsiblefor the expression of mesenchymal markers and the observedincrease invasion in mammary cell lines (Le Bras et al.).

PTEN*:* PTENacts as a tumor suppressor, which is inactivated in many sporadic cancers (for review see (Chalhoub and Baker 2009)). PTEN antagonizes the activity of PI3K by dephosphorylating phosphoinositides. PTEN prevents junction instability and is consequently implicated in cell migration and invasion, extracellular matrix interaction and cellular polarity(Lin et al. 2007)**.**

4.7 Regulation by endocytosis

Cadherin molecules are not always stably exposed at the cell surface but are constantly turning over in a high dynamic way through exocytic and endocytic events (Akhtar and Hotchin 2001; Xiao et al. 2005) (Figure 2)**.**Endocytic pathways are oftenmisregulated in cancers and a shift in the balance betweenrecycling and degradation can result, for example, in the degradation of E-cadherin and increased cell migration. Endocyticsignaling pathways enclose a vast number of mechanisms (see for review (Platta and Stenmark 2011; de Beco et al. 2012; Sigismund et al. 2012). E-cadherin endocytosis can be mediated by clathrin-mediated vesicles or non clathrin pathways (for review (Delva and Kowalczyk 2009).

4.7.1Clathrin-mediated endocytosis pathway

Table 1: Phosphorylation regulators of AJ

Junction dynamics are regulated by transient shifts in protein phosphorylation or dephosphorylation under the control of specific phosphatases. This table sums up the key phosphatases implicated in AJ regulation.

	Substrate	Effect
PP2A	E-cadherin	Sequesters PP2A at AJ to facilitate TJ assembly
	VE-cadherin	Prevents Ser phosphorylation and vascular junction disassembly
SHP2	β-catenin, VE-cadherin	Prevents β-catenin phosphorylation and disruption of VE-cadherin endothelial AJ complexes
	P190RhoGAP	Modulates RhoA activation
	Src, FAK	Indirectly up-regulates ERK1/2 activity, decreased FAK phosphorylation, decreased AJ and TJ proteins internalized
PTP1B	β-catenin, E-cadherin	Dephosphorylates and stabilizes E-cadherin: β-catenin complex at AJ
	VEGFR	VEGFR dephosphorylation stabilizes cell-cell contacts
PTB-PEST	RhoA- Rac1	Promotes RhoA and limits Rac1 activity to enhance AJ assembly; Prevents aberrant epithelial cell motility
RDTPμ	Cadherins	Dephosphorylates cadherins; stabilizes intercellular contacts
PTPσ	β-catenin, E-cadherin	Dephosphorylation, prevents their removal from AJ

Table 2: Endocytic pathways for AJ

The table resumes the different endocytic pathways for E-cadherin and the protein actors involved.

Internalization route	Cadherin	Adaptators and regulators
Clathrin mediated	VE-cadherin	p120ctn, β-arrestin, VEGF, Ang1, AP-2
	E-cadherin	p120ctn, Dab2, β-catenin, PIPKIγ, Rac1/ IQGAP1, FGF, HGF
	N-cadherin	NMDAR, β-catenin
Caveolea mediated	E-cadherin	Caveolin-1, Rac-1
Lipid raf mediated	Dsg3	Tyr phosphorylation
	E-cadherin	Arf6
Macropinocytosis	E-cadherin	EGF,Rac-1
	B-catenin	B-catenin, Rac-1/ IQGAP1

Degradation or recycling of E-cadherin is dependent on its phosphorylation state. In fact, internalization of E-cadherin from AJ is initiated by the Src-mediated tyrosine phosphorylation of E-cadherin (Papkoff 1997; McLachlan et al. 2007). This posttranslational modification induces the dissociation of p120ctn from E-cadherin, and the binding of the ubiquitin-ligases, Hakai or Mdm2 which result in the ubiquitination of E-cadherin and internalization within clathrin-coated endosomes and subsequent degradation by the proteasome complex if recycling does not occur (Fujita et al. 2002; Pece and Gutkind 2002; Palacios et al. 2005).

4.7.2Clathrin-independent endocytic pathways

Cadherin turnover is also associated with clathrin-independent endocytic pathways. Studies suggested that cadherin endocytosis may occur through both caveolin-mediated andmacropinocytosis-like pathways. Akhtar and *al.* found that a dominant-active formof the small GTPase Rac1 could disrupt cell-cell adhesion through the endocytosis of E-cadherin. This pathway appears to be distinctfrom the uptake of transferrin, which is clathrin-mediated, and through structures that co-localized with caveolin (Akhtar and Hotchin 2001). Lu et al., provides further evidence for caveolin-mediated cadherin endocytosis; they demonstrated that EGFsignaling could disrupt cell-cell adhesion by triggering the caveolin-mediated internalizationof E-cadherin, a mechanism that may be relevant to EMTin cancers (Lu et al. 2003)**.** In contrast, Bryant and colleagues characterized the EGF-induced internalization of E-cadherin in a breast carcinoma cell line, in which E-cadherin is internalized along with the cadherin-binding proteins p120ctn and β-catenin, as Rac1-modulated macropinocytosis, rather than caveolin-mediated (Bryant et al. 2007)**.** Paterson and colleagues observed E-cadherin endocytosis that is both clathrin- and caveolin-independent, but dynamin-dependent. This pathway, which they identify as similar to macropinocytosis, appears toaffect cadherin that is not engaged in trans-interactions in an AJ(Paterson et al. 2003). Lastly, the desmosomal cadherin desmoglein 3 undergoes lipid-raft-mediatedendocytosis, though it is unclear if this pathway is available to classical cadherins as well(Delva and Kowalczyk 2009)**.** Though some of the specific details of the clathrin-independentpathways remain unclear, it appears that both clathrin-dependent and clathrin-independentendocytic pathways play a role in cadherin turnover and degradation.

4.8 Regulation by proteolysis

In colorectal tumorigenesis, E-cadherin may play a tumor suppressor role or an oncogenic role depending on its degree of proteolysis, which is determined by tumor environment. Variousproteases can mediate the cleavage of either the ectodomain or the cytoplasmic domain of E-cadherin, apost-translational process that substantially changes the functional properties of the protein (for review (Wever et al. 2007)) (Figure 3).

4.8.1 Cadherin ectodomain shedding

The family of membrane-anchored metalloproteases that are known as „a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) proteins are key components in protein ectodomain shedding (Seals and Courtneidge 2003). Several proteases like matrix metalloproteinase MMPs involving stromelysin-1 (MMP3), matrilysin (MMP7), MMP9, and MT1-MMP (MMP14), and serine proteases such as plasminkallikreins 6 and 7, and ADAM10 and 15, can cleave mature E-cadherin (120 kDa) *in vitro* and shed the E-cadherin ectodomain (soluble E-cadherin, sE-CAD) (Lochter et al. 1997; Noë et al. 2001; Davies et al. 2001; Ryniers et al. 2002; Maretzky et al. 2005; Hayashido et al. 2005; Symowicz et al. 2007; Johnson et al. 2007). Several groups have shown that sE-CAD present in cell culture

medium stimulates epithelial cancer cell dispersion and promotes cell-cell junction disruption (Damsky et al. 1983; Wheelock et al. 1987; Noë et al. 2001; Symowicz et al. 2007). The cleaved fragment may still keep functional activity either as paracrine/autocrine competitor of cadherin function or as an anchor for migration when bound to the extracellular matrix. For example, the sE-CAD produced by overexpressed kallikrein-7 in pancreatic adenocarcinomas may function as pseudo ligands to block normal E-cadherin interactions and promote invasion (Johnson et al. 2007). Growth factor, such as HGF, can also stimulate E-cadherin ectodomain shedding (Lee et al. 2007). Indeed, ADAM15-generated sE-CAD appeared to stabilize heterodimerization of the HER2 (ErbB2) receptor tyrosine kinase with HER3, thus leading to Erk signaling, which stimulates both cell proliferation and migration (Najy et al. 2008). Alternatively, heterotypic interactions between ECM-anchored cadherin fragments and other receptors may occur. Interestingly, collagen-binding integrins initiate a signaling cascade that promotes MMP9-dependent E-cadherin ectodomain shedding (Symowicz et al. 2007). Furthermore, HT1080 fibrosarcoma cells adhere in an$\alpha 2\beta 1$ integrin dependent way to pentameric E-cadherin (Whittard et al. 2002). The ectodomain of E-cadherin is also a substrate of secreted cathepsins B, L, and S, often produced by various cells in the tumor microenvironment (Gocheva et al. 2006).

Proteases-mediated cleavage of ectodmain also occurs on N-cadherin, whose gain in expression is associated with loss of E-cadherin expression in cancer cells(Van Aken et al. 2001). Mature N-cadherin (130 kDa) is cleaved by severalenzymes: plasmin, ADAM10, MT1-MMP(membrane type 1-matrix metalloproteinase), MT5-MMPthat shed a 90kDa fragment in the environment. In contrast, presenilin 1 (PSEN1)/γ-secretase cleaves N-cadherin in the cytoplasmic part releasing a free cytoplasmic 35 kDa fragment(Reiss et al. 2005; Covington et al. 2006; Monea et al. 2006). Proteolysis of N-cadherin is a sequential process: 1) ADAM10 associates with N-cadherin and cleaves the extracellular domain at the level of the EC5 domain, resulting in the release of an N-terminal fragment of 90 kDa (soluble N-cadherin, sN-CAD); 2) Then the C-terminal, membrane-bound fragment becomes a substrate for a PSEN1/γ-secretase complex that cleaves it at the membrane-cytosol interface, thus generating a cytoplasmic fragment of 35 kDa(Uemura et al. 2006). This fragment can then regulate transcription by 1) binding to the transcriptional co-activator CBP (CREB binding protein) (CREB = cyclic AMP response element binding protein) and promoting its proteasomal degradation; 2) entering the nucleus to repress N-cadherin transcription and promote β-catenin dependent transcription (Marambaud et al. 2003). sN-CAD conserves its activity as an adhesive ligand when attached directly with collagen or other components of the basement membrane such as fibronectin or laminin, providing a signal for the stimulation of neurite outgrowth or invasion of cancer cells and angiogenesis (Cifuentes-Diaz et al. 1994; Chen et al. 1997; Utton et al. 2001).

4.8.2 Proteolysis of the cytoplasmic domain of E-cadherin: gain of oncogenic function

Nuclear E-cadherin expression has been reported in a few human colorectal primary tumors and hepatic metastases, however its functional implications remain unexplored(Serra et al. 2007; Salahshor et al. 2008; Natalwala et al. 2008; Chetty and Serra 2008).To study the effect of E-cadherin in the formation of metastasis, Céspedes *et al*.,established a colorectal cancer metastasis model by microinjecting SW480-ADH human colorectal cancer cells, transfected with E-cadherin, in the ceca of nude mice (Céspedes et al. 2010). They found that peritoneal tumor foci developed by E-cadherin overexpressing cells presented an increase in E-cadherin proteolysis and nuclear translocation, and enhanced expression of proteolytically active PSEN1, which was linked to increased tumor growth and shortened mouse survival. These foci showed aggressive growth, suggesting that nuclear E-cadherin translocation may represent an oncogenic event. It is also consistent with the ability of

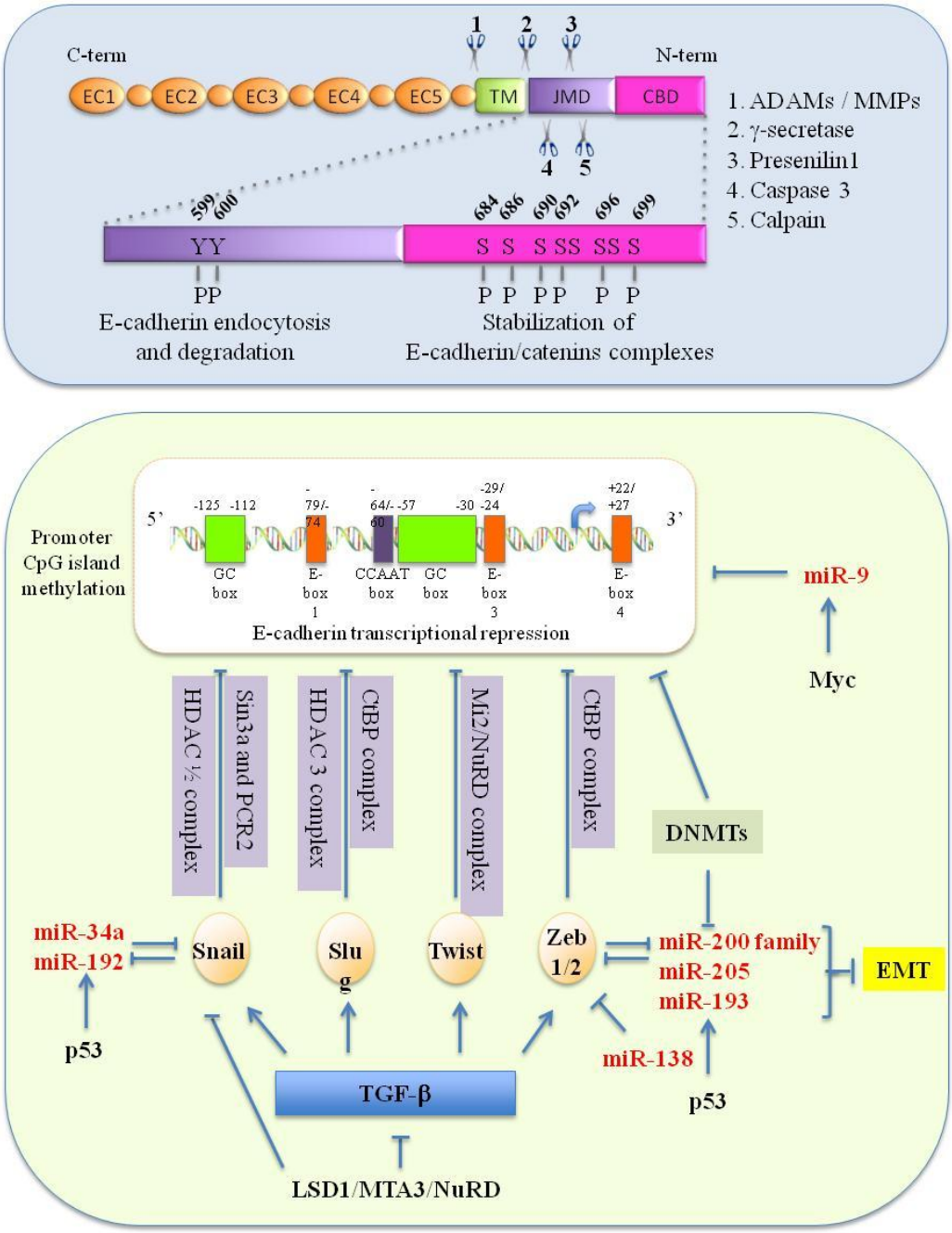


Figure 3: Transcriptional and post-transcriptional regulation of E-cadherin.

Transcriptional regulation (lower panel): E-cadherin promoter with negative regulators such as Snail, Slug, Twist and Zeb1/2 transcription factors. Epigenetic silencing has been associated with CpG methylation in the promoter region and binding of specific transcriptional repressors to E-box sequences in the promoter. Upon TGF-b stimulation, the transcription factors could recruit various DNA/Histones modification complexes to repress E-cadherin and initiate EMT. LSD1/MAT3/NurD represses TGF-b and Snail. miR-200 family negatively regulates Zeb1 and 2, while it is negatively regulated by DNMTs mediated epigenetic silencing. miR-34a and miR-192 activated by p53 negatively regulate Snail, while miR-138 repress Zeb2.miR-9 activated by myc directly represses E-cadherin. CtBP, C-terminal binding protein; CCAAT/ enhancer binding protein; DNMTs, DNA methyltransferases; HDAC, histone deacetylase, sin3A, histone deacetylase subunit; miR, microRNA.

Post-transcriptional regulation involved proteolysis of E-cadherin and phosphorylation (upper panel). Cleavage sites of the proteases are shown by the scissors symbol. Ectodomain shedding occurs when matrix metalloproteases (MMPs) or disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) molecules cleave a stable 80kDa soluble fragment. Proteolysis of the cytoplasmic domain is mediated by g-secretase, caspase 3, presenilin 1 and calpain. Regulation by phosphorylation involves tyrosine phosphorylation by receptor tyrosine kinase or the homologue of the Rous sarcoma virus oncogene protein (c-Src). These phosphorylations may lead to endocytosis and degradation of E-cadherin and are counteracted by protein tyrosine phosphatases (PTPm). Serine/threonine phosphorylation by glycogen synthase kinase-3B, caseine kinase II or protein kinase D1 stabilizes the E-cadherin/catenin complex.

nuclear E-cadherin to activate a non-canonical Wnt pathway(Ferber et al. 2008). This hypothesis agrees with the competition *in vitro* between E-cadherin cytosolic tail and LEF1 for the binding to β-catenin, leading to the suppression of LEF1-mediated transactivation in SW480 cells (Sadot et al. 1998; Orsulic et al. 1999). In this model, the ratio between full-length and proteolyzed cytosolic E-cadherin changes with the environment. Thus, depending on the organ where the tumor grew, the dramatic oncogenic effect can be observed or not. This effect is probably related to the amount of active PSEN1 present in a given environment and with the total cellular levels of E-cadherin. An oncogenic effect in colorectal carcinoma has also been recently demonstrated for EpCAM, another epithelial-specific cell adhesion molecule that is overexpressed, proteolysed, and translocated to the nucleus (Maetzel et al. 2009; Munz et al. 2009).Like E-cadherin EpCAM can be proteolyzed following sequential cleavage by TNFα converting enzyme (TACE/ADAM17) and a γ-secretase complex containing presenilin 2 (PSEN-2), thus releasing the extracellular domain into the culture medium, and the cytoplasmic domain into the cytoplasm where it takes part to the large nuclear complex containing transcriptional regulators β-catenin/TCF/LEF complex (Denzel et al. 2009). Finally, other enzymes like caspases and calpain cleave E-cadherin in its cytoplasmic part releasing an intracellular 37 kDa c-terminal fragment(Steinhusen et al. 2001; Rashid et al. 2001; Rios-Doria et al. 2003). This fragment disturbs β-catenin subcellular localization and stimulates β-catenin dependent cyclin D1 expression in the human keratinocyte HaCaT cell line, stimulating cell proliferation and migration rather than cell-cell adhesion (Maretzky et al. 2005).

In conclusion, the role of E-cadherin in colorectal cancer will depend on the relative abundance of full-length and proteolyzed E-cadherin species within the tumor cell. Membranous full-length E-cadherin promotes differentiation, intercellular adhesion that restricts invasion and migration and inhibits tumorigenesis. Consistently, its deletion or down-regulation in animal models or in humansexerts opposed effects favoringtumorigenesis by activating the Wnt/β-catenin and other signaling pathways(Dorudi et al. 1993; Perl et al. 1998; Nelson and Nusse 2004; Shitashige et al. 2008). Accordingly, an association exists between increased membranous E-cadherin expression in human primary colorectal tumors and favorable outcome (Elzagheid et al. 2006). If proteolyzed E-cadherin fragmentspredominate over full-length E-cadherin, these fragments would induce cell-cell dissociation, and migration or translocate to the nucleus and activate an oncogenic program. This is in agreement with the reported changes in the ratio of membranous and cytosolic E-cadherin depending on the metastatic site of colon tumors, and its association with tumor recurrence in colorectal cancer patients(Elzagheid et al. 2006).

5. Transcriptional and Epigenetic regulation of adherens junctions

Development of cancer is a consequence of both genetic and epigenetic lesions. The former result from mutations or gain or loss of DNA sequence, whereas the latter result from hereditable changes in chromatin, such as DNA-associated proteins post-translational modifications as methylation, phosphorylation or acetylation. Inactivation of E-cadherin is thought to be an important step in the development of mostepithelial derived tumor types. Mutations within the E-cadherin gene have been identified as the cause of familial gastric cancer and loss of expression of E-cadherin has been found to be widespread in sporadically occurring epithelial tumors. Inactivating mutations, such as found in gastric and breast cancer are absent in colon cancers (Lombaerts et al. 2006), thus, the mechanisms of E-cadherin down-regulation in colon cancer mainly involves epigenetic regulation (Figure 3). Epigenetic regulation encompasses three types of changes: DNA methylation, histone

modifications, and microRNAs, each of which has been shown to play a key role in controlling EMT and cancer metastasis (for review Wang & Shang, 2013).

5.1 Promoter methylation

The silencing of E-cadherin expression by hypermethylation is a common event in cancer (Strathdee 2002; Berx and van Roy 2009). In colorectal carcinoma, Darwanto *et al.*, showed that methyl-CpG-binding protein (MeCP2) and 5‟CpG island hypermethylation cooperatively regulate E-cadherin gene (Darwanto et al. 2003). DNMTs are recruited to DNA by interaction with chromatin remodeling complexes, and gene silencing is subsequently conferred by the recruitment of methyl-DNA-binding proteins, such as MeCP2, MBD1–4 and Kaiso(Daniel et al. 2002; Hendrich and Tweedie 2003). The methylated CpG island of the repressed E-cadherin promoter is bound by MeCP2 and MBD2. Binding of these nuclear factors results in the recruitment of histone deacetylase (HDACs) to the methylated E-cadherin promoter area, leading to histone H3 deacetylation, which is essential for the silencing of the methylated E-cadherin gene (Koizume et al. 2002). Down regulation of E-cadherin expression by promoter methylation is reversible and fits with the hypothesis that at the metastatic sites, disseminated mesenchyme cancer cells must regain some of their epithelial functions, undergoing a mesenchymal-epithelial transition (MET) (Brabletz et al. 2005). The methylation process can be inhibited through the use of 50-aza-20-deoxycytidineb (5Aza-dC), a nucleoside analog that forms adducts with DNMTs, leading to hypomethylation and increased gene expression (Kurkjian et al.; Jüttermann et al. 1994; Bender et al. 1998). Indeed reactivation of E-cadherin expression has been observed in certain cancer cell lines upon treatment with this demethylating agent (Yoshiura et al. 1995; Graff et al. 1995).

5.2 Transcriptional repression

The E-box-binding factors Snail, Slug, Twist and zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2 (ZEB1 and ZEB2, respectively) were originally characterized as transcriptional repressors of cell adhesion genes that encode components of AJ such as E-cadherin but also desmosomes and TJs (Thiery et al. 2009; Tiwari et al. 2012). Two of these transcription factors, Snail and Twist1, have been considered to be master regulators of EMT (Peinado et al. 2007; Thiery et al. 2009; Nieto 2011). Snail is not expressed in normal colon, whereas cancers exhibit a high expression of the protein (Peña et al. 2009). Repression of E-cadherin by Snail/Twist involves the recruitment of repressor complexes that inhibit gene expression through chromatin remodeling such as HDAC and polycomb proteins. Deacetylation of histones by HDAC prevents the opening of chromatin and the binding of the transcription machinery whereas polycomb proteins act as a platform to recruit DNMT, suggesting that the two epigenetic mechanisms could intersect (Viré et al. 2006). Snail1 interacts with histone deacetylase (HDAC) 1 and 2, SIN3a and components of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) (Batlle et al. 2000; Cano et al. 2000a; Herranz et al. 2008). Snail2/Slug recruits co-repressors such HDAC1/3 and C-terminal binding protein (CtBP) (Hemavathy et al. 2000; Hajra et al. 2002; Bolós et al. 2003). Studies in several cancer cell lines showed that CtBP and Smad proteins co-repressor complexes might also collaborate in the repression of CDH1 with ZEB factors (Shi et al., 2003; van Grunsven et al., 2003; Grooteclaes & Frisch, 2000). Importantly, CtBP seems to be crucial in controlling CDH1 expression in colorectal tumors as they can regulate ZEB1 activity (Peña et al. 2006). The mechanism underlying Twist-mediated repression of E-cadherin is less known but seems to involve several other components such as the Mi2/nucleosome remodeling and deacetylases (Mi2/NuRD) complex (Fu et al. 2011).

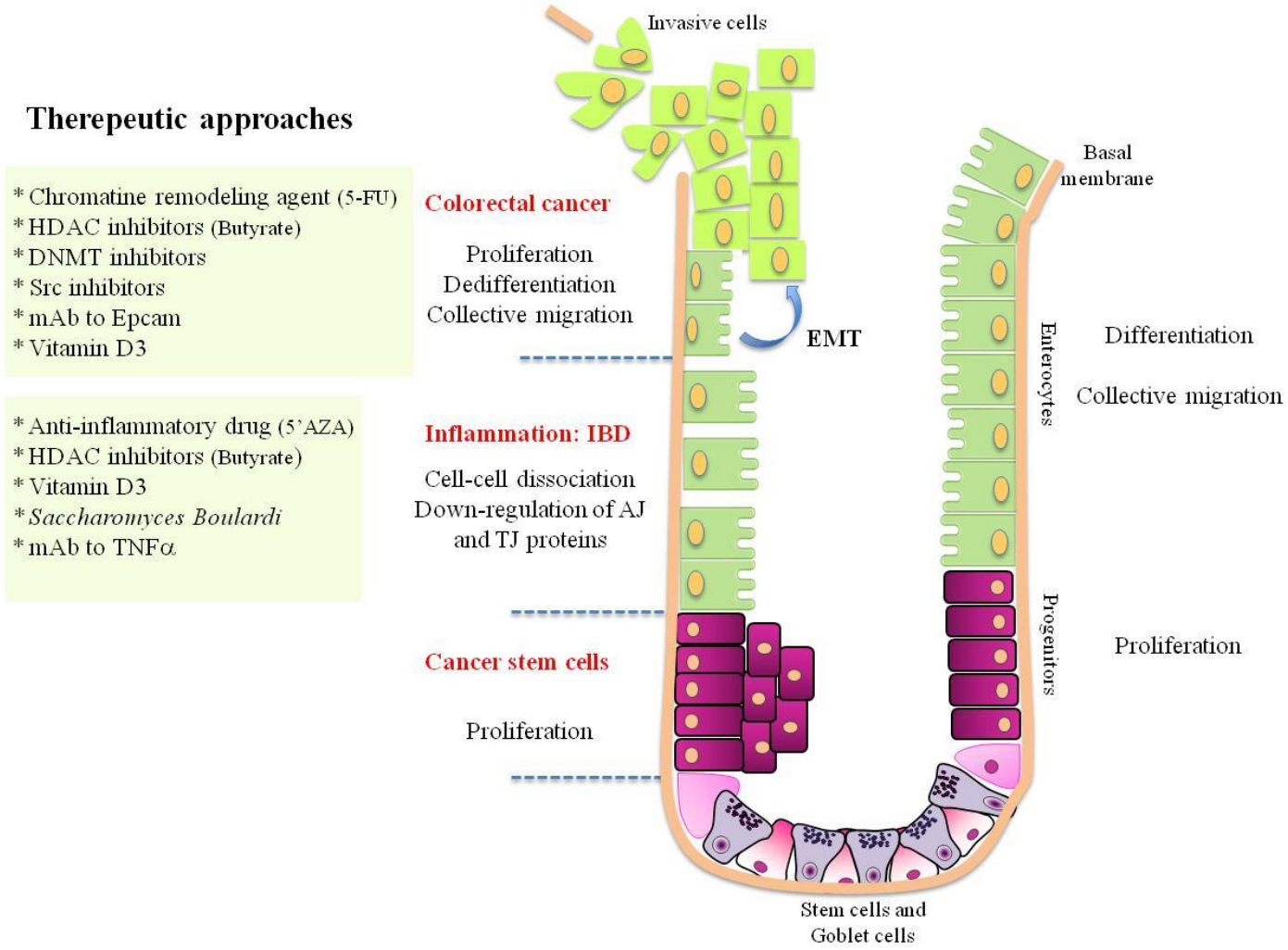


Figure 4: Pathologies associated with the intestinal epithelium

1) Embryonic stem cells (ESC) form compact colonies due to intercellular adhesion dependent of E-cadherin-catenin complexes. These interactions constitute a driving force in survival, self-renewal and pluripotency maintenance of naïve ESC. 3) However they can transform into cancer stem cells and then proliferate.

2) Inflammatory bowel diseases (IBD)develop following alteration of the epithelial barrier, which increases intestinal permeability. Default in epithelial barrier results from cell-cell dissociation and down-regulation of junctional proteins. 3) Long-standing IBD favors the development of colitis-associated colorectal cancers (CAC), where normal colonic epithelium becomes hyper-proliferative and forms adenomatous polyps that progress to malignant diseases. In sporadic colorectal cancer, E-cadherin downregulation and p120ctn delocalization have been reported to associate with dedifferentiation, progression, and metastasis.

5.3 microRNAs

MicroRNAS (miRNAs) are highly conserved, small noncoding RNA molecules of 19–24 nucleotides which bind to the complementary sequences within target mRNA molecules. They post-transcriptionally govern gene expression, thus affecting a broad range of physiological processes. However miRNA have been shown to be aberrantly expressed and to play causal roles in a variety of pathologies including cancer (Ching-Wen et al. 2014; Díaz-López et al. 2014). During the last years, the implication of a growing number of miRNAs in the regulation of EMT transcription factors or EMT-related pathways has been observed in several human tumor contexts (for review (Díaz-López et al. 2014). Interestingly, poorly differentiated carcinomas present an overall decrease of total miRNA expression, suggesting a role for the miRNAs in the regulation of different mechanisms governing epithelial plasticity (Lu et al. 2005) (Figure 3). A few miRNAs have been involved in the direct regulation of E-cadherin expression but it was shown that miR9 directly targets the E-cadherin gene in breast cancer cells (Ma et al. 2010). miR-9-mediated E-cadherin down-regulation results in the activation of β-catenin signaling, which contributes to up-regulated expression of mesenchymal and angiogenic genes required for metastatic outgrowth. Several miRNAs have been identified that directly target key transcription factors involved in EMT, such as Snail and Zeb, while others modulate various signaling pathways that promote EMT. The best example is the miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429). The miR-200 family reduces the expression of the transcription factors Zeb-1 and 2 and, conversely, Zeb-1 and 2 repress the expression of the miR-200 gene cluster, thereby generating a regulatory loop that can reinforce the ability of Zeb proteins to maintain a stable mesenchymal phenotype, as observed at the invasive front of colon carcinoma cells (Burk et al. 2008; Bracken et al. 2008). According to modulation of signaling pathways that promote EMT, Smad dependent-TGFβ-signaling induced miR-155 expression leading to reduce RhoA expression and the dissolution of cell TJs (Kong et al. 2008). p53 also induces the expression of miR-34a and miR-192, which then repress Snail1 and Zeb2, respectively, to block EMT (Kim et al. 2011b; Kim et al. 2011a). miR-138 can also repress Zeb2 to suppress EMT (Liu et al. 2011).

Recently it has been shown that specific miRNA repression could be achieved by CpG miRNA promoter hypermethylation. This novel mechanism increases the mesenchymal characteristics of tumor cells. Epigenetic regulation of the miR-200 family and its relationship with aggressiveness and chemoresistant behavior has been established in different cancer cell types including colon and breast carcinomas (Davalos et al. 2012; Wee et al. 2012; Díaz-Martín et al. 2014). Hypermethylation of the miR-34 promoter is found in prostate tumors (80%) and in melanoma (63%); it is also present in many cell lines derived from breast, colon, lung, and other types of tumors.

6. Role of AJ in intestine physiopathology: From development to colorectal cancer

6.1 Role in stem cell biology and embryology

Development, organization and homeostasis of most of animal tissues and organs depend on the formation of specific cell-cell junctions (Figure 4). The spatiotemporal expression pattern of cadherins during embryogenesis is critical for cell migration, cell differentiation and tissue morphogenesis. In this line, E-cadherin knockout embryos fail to undergo proper embryogenesis and do not form the trophectoderm epithelium (Larue et al. 1994). In the postnatal environment, cadherins play a role in the maintenance of tissue architecture and physiological homeostasis of mature tissues (Takeichi 1995; Brasch et al. 2012). Recently, various studies focused on the roles of cell–cell

adhesion complexes in stem cell self-renewal and differentiation, and their effect on stem cell fate and somatic cell reprogramming (for review (Pieters and van Roy 2014)). The major characteristic of stem cells is their self-renewal capacities, correlated with signals that retain cells in an undifferentiated state, which is fundamental for their pluripotency and limitless proliferation. Key signals in this process are provided by components of the Wnt pathway, LIF/STAT3 and c-Myc, and by transcription factors Nanog, Oct3/4, Klf4, and Sox2(Jaenisch and Young 2008). Embryonic stem cells (ESC) form compact colonies due to intercellular adhesion dependent of E-cadherin-catenin complexes. These interactions constitute a driving force in survival, self-renewal and pluripotency maintenance of naïve ESC (Li et al. 2010). E-cadherin also participates in the differentiation of stem cells in well-differentiated teratomas or in chimeric animals by interacting with key components of the naive stemness pathway. In addition, depleting E-cadherin converts naive mouse ESC into primed epiblast-like stem cells (EpiSC) (Bao et al. 2009). Mouse ESC exclusively expresses E-cadherin at the cell membrane, whereas mouse EpiSC express both E- and N-cadherin. In line with this, a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) occurs during reprogramming of somatic cells towards induced pluripotent stem cells (iPSC), leading to down regulation of N-cadherin and acquisition of high E-cadherin levels(Takahashi and Yamanaka 2006). E-cadherin up-regulation considerably increases reprogramming efficiency and the established iPS cells possess E-cadherin-mediated cell–cell contact, morphologically indistinguishable from ESC (Chen et al. 2010). Consistently, abrogation of cell-cell contact by an inhibitory peptide or a neutralizing antibody directed against the extracellular domain of E-cadherin compromises iPSC generation. Thus, MET is essential for iPSC formation and can be induced by Klf4 (a transcription factor involved in the epithelial cell differentiation) or BMP signaling (Chen et al. 2011; De Craene and Berx 2013). Klf4 competes with the transcription factor Zeb2 to bind and activate the E-cadherin promoter (Yori et al. 2010; Koopmansch et al. 2013).

Together with E-cadherin, β-catenin exerts a dual function in stem cell biology: first, its interaction with α-catenin at cell junctions in ESC is responsible for the adhesive function of β-catenin, which might be crucial in the formation and maintenance of ESC colonies as well as for maintaining their naive state (Soncin et al. 2009); second, β-catenin participates in Wnt signaling and within the nucleus it stimulates transcription of genes important for stemness(Wray and Hartmann 2012; Martello et al. 2012).

Evidence is rising that other junctional proteins may play a role in stem cell biology. This is particularly true for the Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), which has been described to participate in stem cell signaling (for review (Munz et al. 2009)). EpCAM is a 30/40 kDa type I glycosylated membrane protein located at intercellular junction spaces that was first described as a dominant antigen in human colon carcinoma tissue (Herlyn et al. 1979). EpCAM is expressed in a variety of human epithelial tissues, and strongly expressed in cancers, progenitors and stem cells (Trzpis et al. 2008; Munz et al. 2009). Structurally, EpCAM comprises an extracellular domain with epidermal growth factor (EGF)- and thyroglobulin repeat-like domains, a single transmembrane domain, and a short 26-amino acid intracellular domain called EpICD. Additionally, EpCAM is connected to the cytoskeleton upon interactions of EpICD with α-actinin (Balzar et al. 1998). Like cadherins, EpCAM can mediate cell-cell contacts but also transmits signals from the plasma membrane into the nucleus in order to regulate gene transcription after proteolysis. Indeed EpICD fragment contains a binding sequence to LEF-1 DNA consensus sites (Denzel et al. 2009). The resulting nuclear complex up-regulates target genes including i) *c-myc* and *cyclins*, and additional genes involved in cell growth and proliferation, cell cycle, and cell death (Münz et al. 2004; Maaser and Borlak 2008); ii) key factors of the conversion of somatic cells into pluripotent stem (iPS) such as Nanog, Klf4, Sox2 and Oct4(Hanna et al. 2009; Lu et al. 2010; Hanna et al. 2010). The Wnt signal transduction pathways, which are used for both EpCAM signaling and regulation of the *epcam* gene is crucial for normal and malignant stem cells (Reya and Clevers 2005; Yamashita et al. 2007). This is

supported by experiments of EpCAM knockdownin murine ESC using siRNA, and by its forced overexpression. EpCAM reduction resulted in diminished proliferation and expression of stem cell markers, whereas forced expression allowed the stabilization of Oct3/4 expression even under differentiating conditions (Kroepil et al. 2013). In contrast to normal cells, in colon carcinoma cell lines, EpICD translocates into the nucleus, where it enhances c-myc transcription and cell proliferation (Denzel et al. 2009; Maetzel et al. 2009). In conclusion, cancer-initiating and normal stem cells, which express high-level of EpCAM molecules may benefit from activated EpCAM for proliferation, self-renewal, and anchorage-independent growth and invasiveness.

6.2 Role in epithelial cell differentiation

Cadherins have functions that extend beyond cell-cell adhesion. These proteins are linked to multiple intracellular signaling pathways, including Wnt, PI3K/Akt and FGF pathways (Nakagawa and Takeichi 1998; Tran et al. 2002; Suyama et al. 2002). Such signaling pathways are particularly important in intestinal cell proliferation and differentiation. However we found that only “mature” AJ are able to induce epithelial cell differentiation (Gout et al. 2004). The maturation of AJ results in part from a crosstalk between integrins and cadherins and takes place in cholesterol -enriched regions called lipid raft where p120ctn is recruited to bind E-cadherin (Chartier et al. 2006; Chartier et al. 2011). Involvement of ECM proteins in the reinforcement of E-cadherin/actin complexes has been previously described in Caco-2 cells (Schreider et al. 2002). In this work, Caco-2 cells cultured on complex ECM, were induced to express apolipoprotein A IV, a marker of IEC differentiation, via the recruitment of integrins. Among basement membrane molecules, laminins present the highest variability in their spatial and temporal expression, either during intestinal development or in the adult (Simon-Assmann et al. 1995; Timpl 1996; Ekblom et al. 1998; Basora et al. 1999). Laminin 111 isoform is able to induce the expression of the differentiation marker sucrase-isomaltase in Caco-2 cells, together with the nuclear shuttling of nucleolin, a transcriptional regulator (Turck et al. 2006). The differentiation process induced by laminin 111 requires the activation of the p38/MAPK. Consistent with these findings, the p38 cascade is known to be crucial in intestinal epithelial differentiation, as this pathway acts on the key intestinal transcription factor, Cdx2 (Houde et al. 2001). Similarly Laprise *et al.*, found that PI3K/AKT pathway activated by cadherins in turn stimulates the p38/MAPK pathway (Laprise et al. 2002).

6.3 Role in inflammation: Example of IBD

Inflammatory bowel diseases (IBD), which include Chron‟s disease (CD) and ulcerative colitis (UC), consist of a measurable over-inflammatory response leading to gut damage (Shih et al. 2008). The etiology of IBD is unclear but it is proposed that genetic susceptibility and environmental factors favor dysfunctional immune response and increased intestinal permeability that participate to the development of IBD (reviewed byKoch & Nusrat, 2012; Scharl & Rogler, 2012). Permeability defects could be due to the pronounced apoptosis that occurs during inflammation processes, however, it has been shown that IEC apoptosis alone is not sufficient for the entire deficit. Several studies have provided evidences for the perturbation of AJ or TJ in IBD, but the question of whether any altered expression of junctional molecules is a primary event in IBD mucosa, or a phenomenon secondary to the inflammatory process has yet to be clarified. It has been hypothesized that permeability defects might represent a primary disorder in CD, since intestinal permeability alterations have been observed not only in inflamed gut tissues but also in areas lacking any sign of macroscopic injury (Marin et al. 1983; Fries et al. 1999). In UC, perturbations in permeability seem to be limited to the inflamed intestinal segment (Gassler et al. 2001; Bouma and Strober 2003). Various junctional molecules are

affected by the actively inflamed status in IBD, in particular the expression of ZO-1, occludin, E-cadherin and desmoglein-2 (Gassler et al. 2001). Transgenic animal models revealed the importance of E-cadherin in maintaining the epithelial barrier by showing that AJ proteins contributed to IBD-like processes (for review(Hermiston and Gordon 1995; Zbar et al. 2004)). Jankowski and co-workers have demonstrated that deregulation of E- and P- cadherin correlates with the progression of human colitis (Jankowski et al. 1998). E-cadherin mRNA transcripts were clearly expressed in actively inflamed mucosa of CD and UC, whereas the protein is less detected, suggesting a post-transcriptional regulation of barrier integrity as it was observed with cytokines and several GF (TGF, HGF, TNF) (Radford-Smith and Jewell 1996). Using non-invasive techniques, various studies demonstrated an increased intestinal permeability in CD, which is most likely attributed to the disruption of intercellular junctions by Th1 cytokines (TNFα and INFγ) that are characteristic of this disease (Jenkins et al. 1988; Issenman et al. 1993; Munkholm et al. 1994; Miki et al. 1998). IFNγ can prime intestinal epithelial monolayers to respond to TNFα by disrupting TJ morphology and barrier function *via* myosin light chain (MLC) kinase up-regulation and MLC phosphorylation (Wang et al. 2005). The mechanism by which IFNγ induces permeability changes is incompletely understood but it has been associated to endocytosis of occludin, JAM-A and claudin1 following the activation of Rho GTPases (Bruewer et al. 2005).

Differentiation of IEC is likewise affected during chronic colitis; indeed gland atrophy and mucin depletion have been suggested as diagnostic markers for UC (Morson 1972; McCormick et al. 1990). In the Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis murine model, that affects primarily the distal colon, the production of markers of goblet cell is strongly induced in crypts in mildly inflamed mucosa, whereas there is a marked reduction in strongly affected areas in the descending colon (Renes et al. 2002). Because mucins protect the epithelial barrier from luminal pathogens, it seems likely that the epithelium responds to crypt epithelial damage and ulceration during severe inflammation, primarily by increasing proliferation and thus, reduced differentiation (Van der Sluis et al. 2006). Paneth cells at the small intestinal crypt base secrete defensins into the gut lumen that act as potent bactericidal agents (Mastroianni and Ouellette 2009). A loss of defensin expression has been linked to the development of IBD (Wehkamp et al. 2005). Additionally, a decrease in the number of Paneth cells may be seen in active ileitis, whereas increased Paneth cell proliferation and ectopic differentiation in the colon (Paneth cell metaplasia) are observed in regenerating epithelium in chronic colitis (Sandow and Whitehead 1979). Therefore, improper differentiation of IEC not only may cause intestinal inflammation, but could also perpetuate impaired epithelial homeostasis and accelerate intestinal neoplasia (Wada 2009). Long-standing IBD favors the development of colitis-associated colorectal cancers (CAC), which are believed to result from oxidative DNA damage in epithelial progenitor cells (Feagins et al. 2009). In this model, enhanced crypt turnover during inflammation contributes to intestinal tumorigenesis by increasing the likelihood of acquiring mutations in known oncogenes such as APC, whose defect causes familial adenomatous polyposis; this is an early event in the development of a majority of colonic adenocarcinomas.

The chronic inflammatory states may lead to environments that foster genomic lesions and tumors initiation. Furthermore, disorganization of inter-epithelial junctions could participate in the infection process as well as in the cellular dedifferentiation process that precedes carcinogenesis (Jankowski et al. 1997). These epithelial alterations are more pronounced in UC in which the development of malignancies is more frequent than in CD tissues, suggesting that disturbances of junction associated molecules are likely to be involved in carcinogenesis from IBD patients.

Interestingly, recent studies have shown that the Wnt/β-catenin pathway can be activated by inflammatory cytokines during intestinal inflammation, through PI3K/AKT signaling (Kaler et al. 2009; Nava et al. 2010; Lee et al. 2010). Exposure of IEC to inflammatory mediators results in the persistent transcriptional activation of β-catenin mediated by Akt phosphorylation, and this process

leads to increased cell proliferation at the onset of colitis. However, sustained cytokine treatment result in the induction of the β-catenin/TCF target gene Dkk1 (Dickkopf-related protein 1), a potent secreted Wnt antagonist. Consequently, extended intestinal inflammation is associated with a reduction of Wnt signaling in the inflamed mucosa and with excessive enterocyte apoptosis induced by INF-β and mediated by Dkk1. The Barrett laboratory reported that activation of T cells in the intestinal mucosa result in PI3K-mediated phosphorylation of Akt, stabilization of β-catenin, and increase cell proliferation in the crypts. Importantly, inhibition of PI3K was sufficient to prevent the progression from chronic colitis to mucosal dysplasia by inhibiting β-catenin transcriptional activity and thus epithelial hyper-proliferation (Lee et al. 2010). In accordance with these findings, loss of PTEN, a negative regulator of Akt, leads to intestinal polyposis by increasing the activity of β-catenin through Akt (He et al. 2007).

6.4 Role in colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy worldwide (Early et al. 2008). Thepathogenesis is characterized by clinical and histopathological changes known as the adenoma-carcinoma sequence, where normal colonic epithelium becomes hyper-proliferative and forms adenomatous polyps that progress to malignant disease (Lee et al. 2006). Several studies have reported mutations of the tumor suppressor APC gene in CRC (Scott et al. 1995; Sparks et al. 1998; Fodde 2002). These mutations are amongst the earliest genetic events found in the majority (up to 80%) of sporadic cases of CRC (Powell et al. 1992; Schneikert and Behrens 2007; Lee et al. 2013). The main tumor suppressor function of APC has been shown to residein its ability to mediate the proteasomal degradation of cytoplasmicβ-catenin, a key member of the Wnt signaling cascade (Morin et al. 1997). In CRC, mutations of both APC and β-catenin cause deregulation of intracellular β-catenin levels which leads to the nuclear accumulation of β-catenin (Morin et al. 1997). This causes aberrant and constitutive expression of Wnt target genes, and thus the development of CRC (Behrens 2005).

6.4.1 Cadherins in Cancer

Loss of intercellular adhesions by mutations or reduced expression of E-cadherin is a hallmark of epithelial cancer and tumor progression (Takeichi 1995; van Roy 2014). Interestingly, while the gene encoding E-cadherin, *CDH-1*, is found mutated in numerous gastric cancers (Machado et al. 1999), mutations are rare in colon tumors, where E-cadherin function is more favorably shut down at the transcriptional or post-transcriptional level (see section4.5) (Schuhmacher et al. 1999). Overall, the transformation process is characterized by a down-regulation of E-cadherin and an up-regulation of mesenchymal cadherins such as N-cadherin and cadherin-11, which render epithelial cells more invasive (Hazan et al. 2000; Suyama et al. 2002). The switch from E-cadherin expression to P-cadherin also results in the translocation of p120ctn to the cytosol, which in turn induces cell migration by activating Rac1 and cdc42 (Cheung et al. 2010). E-cadherin is described as a tumor suppressor that maintains epithelial integrity and inhibits migration and invasion (Nelson and Nusse 2004). Consistently, forced expression of E-cadherin suppresses tumorigenesis, whereas its loss is associated with adenoma to carcinoma transition in experimental models (Perl et al. 1998). In sporadic colorectal cancer, E-cadherin down-regulation has been reported be associated with dedifferentiationand metastasis, whereas its membranous expression confers better prognosis (Dorudi et al. 1993; Elzagheid et al. 2006). Intriguingly, E-cadherin is expressed in a subset of metastatic lesions in colorectal cancer (Ikeguchi et al. 2001; Batistatou et al. 2006). Because p120ctn participates in stabilizing the cadherin-catenin complex, many cancer types are characterized by a loss or a delocalization of p120ctn (reviewed in (Pieters et al. 2012). However, reduction in E-cadherin

expression impacts on catenin levels and localization, resulting in an acceleration of the tumorigenic development. It is well recognized that inactivation of E-cadherin leads to cytosolic translocation of p120ctn in colon, breast, bladder, lung, pancreas, prostate and stomach tumors, which has been associated with tumor malignancy (reviewed by (Thoreson and Reynolds 2002). Indeed, studies in breast and colon cancer indicated that cytosolic p120ctn controls the invasive phenotype of E-cadherin-deficient tumor cells (Shibata et al. 2004; Bellovin et al. 2005). Recently it was shown that p120ctn interacts with hNanos1, the human ortholog of the Drosophila zinc-finger protein, Nanos (Strumane et al. 2006). Transcription of hNanos1 mRNA is often suppressed afterE-cadherin expression. Conditional expression of hNanos1 in human colon DLD1 cancer cells induces cytoplasmic translocation of p120ctn, up-regulates expression of MMP1 at the mRNA and protein levels, and increases migratory and invasive abilities (Strumane et al. 2006; Bonnomet et al. 2008).

Several mechanisms of E-cadherin repression have been reported in CRC, including gene mutations and promoter hypermethylation. However, transcriptional repression of E-cadherin and associated up-regulation of Snail are also considered to play a role in the progression of CRC (Efstathiou et al. 1999; Wheeler et al. 2001; Roy et al. 2005; Shioiri et al. 2006). Analysis of Snail and Slug expressions in human CRC indicated that the two transcription factors were respectively overexpressed in 78% and 37% of the tumor samples examined (Roy et al. 2005; Shioiri et al. 2006).

6.4.2 Catenins in Cancer

β-catenin and p120ctn act as true molecular switches that favor intercellular adhesion through E-cadherin stabilization in healthy and differentiated epithelium, while they can activate migration and cell proliferation when intercellular contacts are lost. This is a perfect mechanism to regulate homeostasis in the rapidly and constantly renewing intestinal epithelium but it also represents an Achilles‟ heel when it comes to tumorigenesis. Signaling through catenins is affected in many type of cancers but this chapter will focus on GI tumors (for review (Schackmann et al. 2013). For instance, nuclear accumulation of β-catenin is observed in 20 to 90 % of GI cancers (Ogasawara et al. 2006) and p120ctn delocalization is observed in more than 50 % of colorectal cancers, correlating with tumor aggressiveness (Bellovin et al. 2005). p120ctn expression is also down regulated in gastric cancers (56% of analyzed tumors)(Karatzas et al.), 34 % of esophageal carcinomas (Chung et al. 2007) and mislocalized in all esophageal cancers (Stairs et al. 2011). Consistently, mouse models bearing tissue-specific p120ctn deletion develop neoplastic lesions in the oral cavity and esophagus as well as in the intestine(Smalley-Freed et al. 2011).

Deleterious effects of catenin expression are also highlighted by the numerous mutations identified in their genes in GI cancers. For instance, mutations in the genes encoding β-catenin or APC are early events in the neoplastic transformation of CRC (for review see(Markowitz and Bertagnolli 2009)). β-catenin is mutated in 20 to 25 % of CRC depending on the tumorigenic stage (Iwao et al. 1998; Mirabelli-Primdahl et al. 1999). Mouse models with APC deletions or β-catenin overexpression in the intestine are prone to tumor development (Perchiniak and Groden 2011). While in the case of β-catenin, pro-oncogenic effects are directly related to its transcriptional activity with TCF/LEF and the resulting increase in the expression of proliferation and invasion related proteins, the case of p120ctn might be subtler. Indeed, p120ctn exhibits both pro-oncogenic and tumor suppressor properties (reviewed in (Kourtidis et al. 2013)), depending on the isoform and the tissue being investigated. Building the map of p120ctn multiple functions in tumorigenesis is one of the important challenges for the coming years.

6.4.3 Polarity and cancer

Consistently with PAR‟s roles in polarity establishment, these genes are found affected in cancer: PAR-3 is down-regulated in oesophageal carcinoma (Zen et al. 2009), PAR-6 is overexpressed in breast and lung cancer (Nolan et al. 2008; Al-Saad et al. 2008; Viloria-Petit et al. 2009) and αPKC is also overexpressed in hepatocellular carcinoma, bladder, pancreatic, head and neck and breast cancers (Martin-Belmonte and Perez-Moreno 2012).

One particular PAR protein has been extensively studied in the context of tumorigenesis, the serine/threonine kinase PAR-4, known as LKB1 in mammals. Indeed, mutations in LKB1 are responsible for Peutz-Jehgers syndrome (PJS), a condition in which patients display a high incidence (93%) of cancer in various epithelial tissues and develop intestinal polyps (Hemminki et al. 1998; Giardiello et al. 2000) making of this kinase a tumor suppressor. LKB1 was described to act in different pathways such as the regulation of cell growth, energy metabolism and cell polarity. Through the activation of AMPK and the downstream regulation of mTOR pathway, LKB1 can modulate cell growth and proliferation depending on the metabolic status of the cell. In human epithelial cells, LKB1 is localized at the AJ in an E-Cadherin-dependent manner (Sebbagh et al. 2009). Also, LKB1 activity is required, in conjunction with the MST4 kinase, to form the apical brush border (ten Klooster et al. 2009). Surprisingly, it was shown that LKB1 activation by its associated pseudo kinase STRAD is able to polarize a single epithelial cell (Baas et al. 2004), suggesting that it can also act totally independently of intercellular contacts. Apart of Peutz-Jeghers syndrome, loss of heterozygosity of LKB1 is found in sporadic cancers, among which breasts and colon cancers (Forster et al. 2000). Interestingly, mice model depleted for LKB1 resumed the clinical observation of GIl polyps that remain benign and rarely become malignant (Bardeesy et al. 2002). Specific depletion of LKB1 in the small intestine leads to an alteration in Paneth and Goblet cells differentiation (Shorning et al. 2009).

6.4.4 Role of EPH receptor in cancer

The role for erythropoietin-producing hepatoma (EPH) receptors in cancer has been recently reviewed by Li *et al.*, and will be treated as a chapter in this book (Li et al. 2014). In this section, we will focus on the mutual regulation between EPH receptors and E-cadherin-based cell-cell adhesions. For example E-cadherin co-localizes with EPHA2 in cell-cell contacts along the lateral membranes of normal epithelial cells and the loss of E-cadherin results in the associated loss of EPHA2. Consistently, the expression of E-cadherin is required for EPHA2 phosphorylation and localization showing that E-cadherin can regulate the expression and subcellular localization of EPHA2 (Zantek et al. 1999; Orsulic and Kemler 2000). Conversely, the ligand-mediated activation of EPHA2 enhances E-cadherin–based cell-cell contacts, as well as the apical-basal polarization of epithelial cells (Miura et al. 2009). Moreover, although EPHA2 is overexpressed in metastatic breast cancer cells, as well as in gastric and colorectal cancers exhibiting liver metastasis, its phosphorylation and E-cadherin expression level are decreasedsuggesting that EPHA2 activation in metastasis is independent of E-cadherin-induced phosphorylation (Zantek et al. 1999; Saito et al. 2004; Yuan et al. 2009; Hou et al. 2012). Such phosphorylation of EPHA2 could occur through various GF signaling involved in the EMT process (Miao et al. 2009). Furthermore, overexpression of EPHA2 promotes the destabilization of AJ and the migration of breast cancer cell by a mechanism involving RhoGTPase regulation (Fang et al. 2008; Hiramoto-Yamaki et al. 2010). In a same manner, overexpression of EPHA2 resulted in up-regulation of the EMT molecular markers N-cadherin and Snail and down-regulation of E-cadherin through canonical Wnt signaling in gastric cancer cells (Huang et al. 2014). These results indicate that

E-cadherin and ligand-independent mechanisms represent a predominant approach to activate EPH receptors in human malignancies.

While the expression of EPHB receptors is essential for correct positioning of IEC along the crypt/villus axis *via* the Wnt signaling pathway, the activation of Wnt signaling also induces EPHB expression in initial compartmentalized intestinal tumor cells(Batlle et al. 2002; Clevers and Batlle 2006). Later on, the loss of EPHB receptors accelerates the progression of colorectal cancer (Batlle et al. 2005). Studies in SW480 colon cancer cells have shown that EPHB2 and EPHB4 are two TCF/β-catenin-regulated genes. Moreover, the preferential binding of β-catenin to CBP rather than p300, contributes to cancer progression and metastasis by increasing the expression of EPHB4 and decreasing the expression of EPHB2 (Kumar et al. 2009). In contrast, EPHB3 can act as a tumor suppressor by two ways: i) it might affect the redistribution of cellular E-cadherin to the plasma membrane, thus enhancing E-cadherin–mediated cell-cell adhesion through the Rac1 pathway (Chiu et al. 2009); ii) by promoting compartmentalization, it restricts the spreading of EPHB-expressing tumor cells into EPHRINB1-positive regions (Cortina et al. 2007). In addition, EPHB3 overexpression induces an up-regulation of E-cadherin, as well as a decrease in nuclear β-catenin. Moreover, TCF/β-catenin activity was found to be reduced in EPHB3-overexpressing colon cancer cells (Chiu et al. 2009). These results indicate that EPHB3 receptor acts as cancer suppressor through the inhibition of the Wnt signaling pathway.

6.5 The intriguing Liver-Intestine cadherin

Liver–intestine (LI)-cadherin (also referred as CDH17) is a member of the cadherin superfamily, although it contains seven molecular domains rather than five (Berndorff et al. 1994; Gessner and Tauber 2000). Moreover, the cytoplasmic domains of this cadherin is truncated and lacks the two armadillo protein-binding domains, which are typical of classical cadherins. LI-cadherin is located solely on the basolateral surface of enterocytes and Goblet cells in the intestine and colon but is absent ofthe apical plasma membrane and so excluded from AJ(Berndorff et al. 1994). In contrast to E-cadherin, LI-cadherin is exclusively localized in cholesterol-rich microdomains and its expression is strictly dependent on cholesterol levels. LI-cadherin is one of the transcriptional targets of Cdx2, which proved to be important during early differentiation and maintenance of intestinal epithelium (Freund et al. 1998). During mouse embryogenesis LI-cadherin expression in the intestinal epithelium begins at embryonic day 12.5 (Angres et al. 2001). The expression onset coincides with the formation of intestinal villi. Excessive tissue remodeling, growth, and differentiation characterize this developmental stage, howeverthe exact biological function of LI-cadherin is currently not known (for review (Baumgartner 2013)). It has been speculated that due to the high lateral mobility, LI-cadherin could be responsible for fast and flexible initial formation of adhesive contacts between cells in development and during tissue regeneration (Gessner and Tauber 2000; Wendeler et al. 2007; Bartolmäs et al. 2012). Thanks to its heterophilic interaction with E-cadherin it might also regulate E-cadherin mediated adhesion (Baumgartner et al. 2008). In pathological conditions, the distribution of LI-cadherin expression can be changed as up or down-regulation of LI-cadherin expression might be correlated with tumor generation and metastasis. A study of human colorectal cancer showed that reduced LI-cadherin expression is associated with high tumor grade, lymphatic invasion and lymph node metastasis (Takamura et al. 2004). This is in principal concordance with the function of other cadherins, which inhibit tumor growth. However, LI-cadherin up-regulation was also described in advanced stage of gastric, hepatocellular or colorectal carcinomas (Liu et al. 2009; Wang et al. 2012; Bartolomé et al. 2014). It is presently not understood if the up-regulation of LI-cadherin in cells normally lacking it is a cause for the tumor progression or if LI-cadherin is up-regulated to compensate the impaired E-cadherin mediated adhesion in the corresponding tumor cells.Activation of

α2β1 integrin by LI-cadherin was recently implicated in increasing proliferation of highly metastatic colorectal cancer cells and in increasing adhesion of tumor cells to collagen type IV (Bartolomé et al. 2014). LI-cadherin silencing in such cells suppressed tumor growth *in vivo* as well as liver metastasis, and this was associated with reduced FAK activation and RAS signaling.

6.6 EMT in physiological and pathological adherens junctions-dependent processes

EMT can be induced by a large variety of stimuli, ranging from GF signal transduction pathways to the loss of E-cadherin function by protein degradation or gene mutation. In many carcinomas, the tumor-associated stroma produces a variety of growth factors (HGF, EGF, FGF, IGF) and cytokines including different members of the TGFβ superfamily, Wnt and Notch (for review (Thiery and Sleeman 2006; Mani et al. 2008; Regard et al. 2011); all of which are able to induce the expression of various transcriptional repressors of E-cadherin gene expression, including Snail-1 and 2, Zeb1 and 2, and Twist.

6.6.1 Modification of adhesion process that occurs during EMT

During EMT, cells lose their epithelial polarity and dissolve their adherent and tight junctions, favoring a high plasticity in cell-cell adhesion and communication with the ECM through focal adhesions. The Armadillo-catenin proteins are often lost from the cadherin-mediated cell-cell contacts and shuttle to the nucleus to potentiate EMT signaling events (Stemmer et al. 2008). A Rho-mediated network of stress fibers, at the tip of which ECM adhesion molecules localize, replaces circumferential F-actin fibers (Vasioukhin and Fuchs 2001; Bates et al. 2006; Vignjevic et al. 2007). These changes are sufficient for the cells to separate, lose their apico-basal polarity and gain a more fusiformshape, all facilitating cellular migration (Hugo et al. 2007). However, cells produced by EMT are not always motile and invasive. The expression of intermediate filaments is also changing during EMT, and vimentin, a typical filament of mesenchymal cells, replacesfor instance cytokeratin being characteristic of epithelial cells. Matrix metalloproteases such as MMP-1, -2, -3, -7 and -14 are frequently up-regulated, potentially enabling cells to detach from each other (*via* cadherin ectodomain shedding) and to penetrate the basement membrane. ECM synthesis changes from basal lamina proteins to interstitial forms including collagen type I, fibronectin, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and tenascin C (Nguyen et al. 2005).

6.6.2 EMT and CRC

Invasion by colorectal carcinomas is characterized by an EMT-like “dedifferentiation” of the tumor cells. However a re-differentiation towards an epithelial phenotype, resembling a MET is detectable in metastases. This indicates that malignant progression is based on dynamic processes, which cannot be explained solely by irreversible genetic alterations, but must be additionally regulated by the tumor environment. The main oncoprotein in CRC is β-catenin, which is overexpressed due to mutations in the APC tumor suppressor in most cases. EMT of the tumor cells is associated with a nuclear accumulation β-catenin, which is reversed in metastases. Nuclear β-catenin is involved in two fundamental processes in embryonic development: EMT and stem cell maintenance. Accumulating data demonstrate that aberrant nuclear expression of β-catenin can confer these two abilities to tumor cells in the adult. The unusual combination of EMT with stem cell competence might result in a migrating tumor stem cell, which drives tumor invasion and metastasis. Although EMT processes are documented in many cancer cell models*in vitro*, the significance of EMT during cancer progression and even its relevance in human cancer tissues has remained a matter of debate. This resistance was

mainly due to the lack of convincing evidence of EMT in clinical samples. The description of cords or small aggregates of tumor cells extending or detaching from the tumor mass into the adjacent stroma have recently provided morphological evidence of EMT at invasive fronts of human tumors (Prall 2007). Similarly, in colon carcinoma, EMT occurs at the invasive front and produces single migratory cells that lose E-cadherin expression. This is concomitant with deregulation of the Wnt pathway and a selective loss of the basement membrane (Brabletz et al. 2001).

6.7 Adherens junctions in collective cell migration

Two modes of cell migration collaborate to assume tissue remodeling events that include embryonic morphogenesis, immunity, wound healing or diseases such as chronic inflammations and cancer metastasis: single cell migration and collective cell migration(Friedl and Gilmour 2009; Thiery et al. 2009). They both include a crosstalk between different cellular adhesion complexes: cell migration at the single cell level as observed during EMT, requires disassembly of cell-cell contacts that occurs concomitantly to the enrichment of cell-ECM interactions, whereas collective migration is a directional cell movement characterized by the maintenance of intercellular contacts that occurs without EMT or with incomplete EMT (For review (Rørth 2009; Etienne-Manneville 2014). In such migration, cells move as clusters of various sizes and forms (sheets, strands, ducts) rather than individually, and use similar actin- and myosin-mediated protrusions and guidance by environmental factors. Furthermore, moving group of cells structurally modify the tissue along the migration path, either by clearing the way or by causing ECM modifications, including the deposition of a basement membrane.Initially restricted to epithelial cell types, which are able to maintain stable cell–cell junctions, the field of collective cell migration now includes cooperative behavior of mesenchymal cells (Theveneau and Mayor 2013).

As discuss previously, EMT process has been clearly demonstrated *in vitro* to increase cancer cell motility and invasion, however the infrequent identification of single invading cells during clinical examination of tumor sections, possibly due to the detection-limit difficulties, has led to a debate about the role of EMT in these processes (Kolega 1981; Zaidel-Bar et al. 2007). *In vivo*, events of EMT can be suggested by the observation of mesenchymal markers increase and a corresponding down-regulation or loss of E-cadherin, as visualized after immunohistochemistry labeling. In both high- and low-grade epithelial cancers, such as breast, colon and prostate carcinoma, distant metastases are typically similar in histology to the primary tumor, with few signs of EMT, suggesting that predominantly collective cell invasion occurs in these cancers (Tarin et al. 2005; Tsuji et al. 2009). Several hypotheses have been advanced to take in account these observations (for review (Friedl et al. 2012): i) invasion and metastasis can take place without EMT; ii) routine pathological examination has difficulty in identifying single cell migration; iii) only small numbers of cells may partially or transiently undergo EMT for invasion.

Evidences for collective invasion of tumor cells came from the analysis of human cancer lesions, in which neoplastic multicellular clusters have crossed the tissue boundaries and have extended into the adjacent stroma while retaining intact cell–cell junctions and intact cadherin expression (Christiansen and Rajasekaran 2006). *In vitro*, Friedl lab showed that implantation of human tumor samples into 3D collagen matrix results in multi-cellular clusters that actively migrate from tissue into the surrounding collagen (Alexander et al. 2008). However, they also provide direct *in vivo* evidence for collective invasion of cancer cells using high-resolution multi-photon imaging together with dorsal skin-fold windows, after injecting HT-1080 fibrosarcoma cells into the deep dermis of mice (Alexander et al. 2008). Similar observations were done by real-time imaging of MTLn3E breast tumors (Giampieri et al. 2009). These two contributions also reported that tumor microenvironment is a key determinant for the choice between singe cell invasive migration and

collective invasion. This can occur by various mechanisms involving: i) chemokines and GF that might be either freely diffusing or tethered to the ECM macromolecules (Shintani et al. 2008); ii) autocrine or paracrine release of soluble factors by cells in the group or stromal cells, such as stromal cell-derived factor 1, FGF and TGF-β (Orimo et al. 2005; Lecaudey and Gilmour 2006; Valentin et al. 2007; Schmidt et al. 2007; Daly et al. 2008; Aman and Piotrowski 2008; Vitorino and Meyer 2008); iii) specific expression of integrins in the leader cells (Hegerfeldt et al. 2002; Haas and Gilmour 2006; Vitorino and Meyer 2008). Together with the differential expression of GF receptors in cells located at the front and rear of the cluster, these factors contribute to maintain the polarity of cells within a cluster (Lecaudey and Gilmour 2006; Friedl and Gilmour 2009). Cadherins and cell-cell adhesions may also be a key determinant of invasion mode. On good example is that down-regulation of E-cadherin, (transcriptional or post-transcriptional) or blockade of β1 integrin during collective migration, leads to transitions in cancer cell invasion modes, rather than stopping the movement (Hegerfeldt et al. 2002; Friedl and Wolf 2003).

Cellular and molecular mechanisms underlying collective migration are still a « work in progress », however several reports highlight the particularly role of active dynamic AJs between motile cells (for review (Ilina and Friedl 2009; Etienne-Manneville 2014). Because cancer is a slow and long-term process that is not readily amenable to direct microscopic observation, most of the data concerning the mechanistic of collective migration came from models based on morphogenesis (*Drosophila ovary* or zebrafish models) or regeneration (astrocytes migration in a wound-healing assays). However, it was hypothesized that collective movements observed during development require cadherin-mediated AJ, which are also involved in the collective invasion of cancer cells and that they share similar mechanistic. Finally, collective cell migration involves diverse processes rather than a uniform process, which depend on both the cell type from which the group originates and the tissue that is transmigrated (Friedl and Gilmour 2009; Theveneau and Mayor 2012). High-resolution confocal microscopy coupled with photoswitchable fluorescent proteins (GFP-tagged E-cadherin), indicate that Src/FAK signaling regulates collective cell migration of the human A431 squamous carcinoma cell line *in vivo* (reviewed by (Serrels et al.). Indeed, treatment of tumors with the kinase inhibitors PF-562,271 and dasatinib, results in a shorter recovery half-time of GFP-E-cadherin at sites of cell-cell adhesion and inhibition of cell migration within the primary tumor (Canel et al. 2010). Further *in vitro* investigation revealed that these dynamic changes in E-cadherin mobility correlate with inhibition of E-cadherin endocytosis, inhibition of collective invasion into a 3D collagen matrix and strengthening of cell-cell adhesion. These imaging studies provide new insights into the existence of regulatory crosstalk between components of AJ and integrin-ECM adhesions *in vivo* (Canel et al. 2013). Using the Drosophila ovary as a model, Cai *et al.*demonstrated that interactions between border and nurse cells function in a positive feedback loop with Rac and actin assembly to stabilize forward-directed protrusion and directionally persistent movement thus contributing to the directed collective migration of border cells between the nurse cells (Cai et al. 2014). Moreover, using the FRET based traction sensor, the authors have assessed the forces exerted through cadherin-mediated contacts and showed that the tension is higher at cells at the front than at the rear of the cluster. In the leader cells, this tension participates in a positive feedback loop, which locally increases GF-induced signaling. E-cadherin-mediated adhesion between individual border cells communicates direction from the lead cell to the followers, whereas E-cadherin-mediated adhesion between motile cells and polar cells holds the cluster together and polarizes each individual cell.

Dynamic role of AJ between motile cells have been studied in astrocytes migrating in a wound-healing assay using fluorescently labeled N-cadherin (Peglion et al. 2014). They found that N-cadherin engaged in AJ undergoes a continuous treadmilling resulting from an actin-coupled retrograde flow along the lateral sides of adjacent leading cells sustained by a polarized recycling of cadherins. At the leading edge, N-cadherin complexes accumulate in a p120ctn-dependent manner

providing material for the continuous formation of new AJ at the front of adjacent migrating cells. GSK3-dependent phosphorylation of p120ctn at Thr^{310} is essential for the regulation of AJ from the front to the rear of migrating cells dynamics during collective cell migration; it induces the local dissociation of p120ctn from AJ and clathrin-coated pits mediated endocytosis of N-cadherin. In p120ctn-depleted cells, N-cadherin endocytosis at the rear is increased, leading to the progressive detachment of the leading cells with an increase cell speed, suggesting that AJ serve as a break for the migration of the leading cells while preventing their separation from the rest of the cluster. In carcinoma cells, loss of E-cadherin expression, together with up-regulation of N-cadherin and neural cell adhesion molecules, may provide a collective migration in which cell-cell junctions are retained similarly to that previously described. High-resolution *in vivo* imaging in the pre-clinical setting will aid understanding of tumor/host interplay and predicting responses to therapeutic intervention.

7. Stress as an example of environmental-mediated alteration of AJ

Intestinal homeostasis depends on the complex network formed by the various cell populations distributed on the different layers of the GI tract. Among these cells, enteric nervous system, immunocytes, and enterochromaffin cells constitute a microenvironment for IEC, capable of regulating their organization as well as their function through cell contact or mediator signals. On one hand, stress modulates the activity of neuroendocrine and immune systems altering the release of cytokines or neuroendocrine factors that may disturb barrier integrity(Black 2002; Gonzalez-Rey et al. 2007; Gross and Pothoulakis 2007; Lightman 2008; Santos et al. 2008). On the other hand, neuronal activation following stress may regulate expression of stress-ligand and receptors as well as their function in IEC, directly according to the close proximity betweenenteric neurons and these cells or indirectly after stimulation of the mucosal immune cells (Neunlist et al. 2003; Yuan et al. 2010a). In this part, we will focus on the role of stress neuromediators are key regulators of intestinal barrier (for review (Ducarouge 2011).

7-1 Stress as an inducer of cell permeability

In the past ten years the influence of psychological and environmental stress on pathogenesis received increased awareness (Miller et al. 2009). In particular, stress is recognized to participate in the development and/or aggravation of GI disorders such as IBD (Mawdsley and Rampton 2006; Hisamatsu et al. 2007; Maunder and Levenstein 2008; Santos et al. 2008; Chang et al. 2011). Stress effects are mediated through the secretion of specific stress neuromediators, such as corticotropin releasing factor (CRF) or its analogs Urocortin 2 and 3 (Ucn2/3) (Santos et al. 2008). These peptides act through the corticotropin releasing factor receptors 1 and 2 (CRF1/CRF2), two class II G protein coupled receptors (GPCR) with different affinities (Hisamatsu et al. 2007). CRF receptors are primarily coupled to Gαs and trigger cAMP formation via adenylyl cyclase activation (Chang et al. 2011). This signaling pathway has been described to be responsible for the intercellular dissociation of IEC (Boucher et al. 2005). In addition to their canonical pathways, GPCRs as well as CRF receptors are able to activate the Src kinase by promoting its auto-phosphorylation on Y-418 (Yuan et al. 2010b). Thus, by modulating the phosphorylation status of intercellular junction proteins, Src activation could lead to the opening of the barrier (Gumbiner 2000). Using HT-29 and SW620 cells, two CRC cell lines differing in their abilities to perform cell-cell contacts, we found that CRF2 signals through Src/ERK pathway to induce the alteration of cell-cell junctions. This occurs throughan increased endocytosis of E-cadherin and the shuttle of p120ctn and Kaiso into the nucleus (Ducarouge et al. 2013). Furthermore, both immobilization stress of rats and intravenous/intracerebral injection of CRF in conscious non stressed rats, lead to increased colonic mucosal levels of cyclooxygenase-2

(COX-2) mRNA and prostaglandin E2 (PGE2) secretion (Castagliuolo et al. 1996; Pothoulakis et al. 1998). RhoA-dependent COX-2 signaling has been shown to disrupt formation of AJ in HCA-7 cells, whereas PGE2 signaling mediates TJ disassembly through a mechanism that involves PKC and claudin1 in Caco-2 cells (Tanaka et al. 2008).

If CRF system is well documented in the GI tract for its expression and regulation by stress and inflammation, its implication in CRC is poorly investigated (Shih et al. 2008; Larauche et al. 2009). Ligands and receptors are expressed and secreted by various normal and cancer cells (for review (Kaprara et al. 2010b)). Not only the level of expression but also the cellular distributions of CRF system component have to be takenin account for their role in cancer. Indeed, CRF2 cytoplasmic pattern was associated with diseases in a more advanced stage (Florio et al. 2006; Miceli et al. 2009). Accordingly, our results describe aberrant expression of CRF2 and ligands in both CRC tumors and cell lines, according to their grade and/or differentiation status (Ducarouge et al. 2013). CRF2 expression and cytoplasmic distribution increase in de-differentiated or metastatic tumors. This suggests a role for CRF2 in the loss of cellular organization and tumor progression. In HT-29 cells, this signaling pathway also leads to the remodeling of cell adhesion by the phosphorylation of FAK and a modification of actin cytoskeleton and focal adhesion complexes. In CRC, the activation of the Src kinase and the associated disturbance of E-cadherin expression and/or localization is correlated to histological grading and is of worse prognosis (Van Aken et al. 1993). Cell-cell dissociation provokes aremodeling of cell adhesion and anincrease in migration and invasion, two major processes in CRC development. The CRF system has been proposed to affect migration and invasion of tumors, thus supporting tumor progression, in part by modulating RhoGTPases activity (Swinny and Valentino 2006; Chen et al. 2008).The CRF induces migration and invasion of B16F10 murine melanoma cells, a process that also depends on a transient ERK activation via the CRF1 (Yang et al. 2007). It participates to actin polymerization and FAK phosphorylation, which lead to MCF-7 motility (Androulidaki et al. 2009). Furthermore, CRF signaling is implicated in carcinogenesis-related process such as proliferation, apoptosis and angiogenesis (Bale and Vale 2004; Chatzaki et al. 2006; Wang and Li 2007; Wang et al. 2008; Jin et al. 2011). Using the 4T1 breast cancer cell line, *Arranz et al*. demonstrated that peripheral CRF modifies the expression of SMAD2 and β-catenin, induces cell proliferation and increases the TGF-β action on proliferation, confirming its impact on TGF-β and Wnt signaling (Arranz et al. 2010).

In conclusion, CRF system mediated-signaling controls cellular organization and may promote metastatic potential of human CRC cells through an EMT-like process. Autocrine/paracrine actions of the CRF system have been suggested to be involved in the microenvironment control of the tumor and neighboring cells (Androulidaki et al. 2009; Kaprara et al. 2010a). In the tumor microenvironment, CRF is released by endothelial and immune cells and by the local neuronal innervations(Baigent 2001).The non-tumoral cells could also be source of CRF ligands, which is influenced by stress and inflammation.

7-2 Crosstalk between CRF and cholinergic systems

Pioneer experiments showing a crosstalk between stress and muscarinic receptors came from experiments in Wistar-Kyoto rats. Comparative analysis of stress-induced cell permeability between Wistar Kyoto and the parent Wistar strain indicated that increase of permeability was higher in Wistar Kyoto rats compared to the parents. An important difference between the two strains is their acetylcholinesterase activity, which is much lower in the Wistar Kyoto rats, suggesting that acethylcholine (ACh) plays a role in these rats prior to restraint stress exposure (Saunders et al. 1997). This, and the fact that atropine, considered to act only in the periphery, can prevent the breakdown of the barrier, suggests the involvement of peripheral cholinergic muscarinic mechanism in the epithelial

tightness (Kiliaan et al. 1998; Santos et al. 1999). More recently, it has been proposed that maternal deprivation (MD)-induced barrier dysfunction was dependent on the release of Ach by enteric nerves following CRF-mediated activation of CRF2 (Gareau et al. 2007). Acute stress also activates cholinergic pathways to trigger exocrine pancreatic secretion. Trypsin released in these conditions may be responsible for colonic barrier alterations through activation of PAR2 (Demaude et al. 2009).

ACh signals through either muscarinic (G-protein-coupled) receptors (mAChR) or nicotinic (ligand-gated ion channels receptors (nAChR), which are expressed in neuronal and non neuronal cells as well as in cancer cells (Brown 1990; Wessler and Kirkpatrick 2008)). Both receptors were identified as important regulators of cancer cells (Shah et al. 2009; Schuller 2009; Von Rosenvinge and Raufman 2011). ACh production results in neurocrine, paracrine and autocrine promotion of cell proliferation, survival and migration. In GI tissue, the major mAChR subunits are M1 mAChR, M2 mAChR and M3 AChR, but colon epithelial cells mainly express M1 AChR and M3 AChR (Kopp et al. 1989; O'Malley et al. 1995; Raufman et al. 2008). Their expression is increased up to 8-fold in cancer compared to normal tissue (Frucht et al. 1999). This overexpression, which is observed in 60% of colon cancer examined, is associated with a drop of degradation and an increase in ACh synthesis (Yang and Frucht 2000).

Colon epithelial cells express muscarinic receptor subtypes 1 and 3 (M1 mAChR and M3 mAChR). In colon cancer cells, activation of M3 mAChR stimulates cell proliferation induced by ACh or bile acid (Cheng and Raufman 2005; Cheng et al. 2008). These agonists binding to M3 mAChR results in MMP7 activation that releases EGF receptor (EGFR) ligand named HBEGF (Cheng et al. 2007; Xie et al. 2009). Co-expression of M3 mAChR and EGFR in many colon cancer cell lines, associated with over-expression of these receptors in the majority of colon cancer, suggest that the functional interaction between M3 mAChR and EGFR is important for colon cancer regulation. The transactivation of EGFR also mediates the effect of M3 mAChR on cell migration and invasion. The downstream signaling involves ERK and PI3K-dependent RhoA activation as well as FAK activation and alterations in the actin cytoskeleton (Calandrella et al. 2005; Belo et al. 2011). In HT-29 and Caco-2, we found that ACh-activated M3 mAChR also results in cell dissociation together with changes in expression and localization of intestinal TJ and AJ proteins, a process associated to epithelial barrier failure (Pelissier-rota et al. 2013). This correlates with the observation that mAChR (in particular M3 AChR) increases epithelial cell permeability (Cameron and Perdue 2007). Furthermore, we showed that M3 AChR not only induces modulation of cell-cell junctions but also regulates cell-MEC interactions that correlate with the acquisition of invasive potential (Pelissier-rota et al. 2013). In our work, the effect of M3 mAChR is in part mediated by CRF signaling since M3 mAChR stimulation stimulates Ucn3 production and CRF2 activation (Pelissier-Rota et al., manuscript in preparation) (Figure 5).

Using different *in vivo* models, Raufman et al.showed that M3 mAChR gene ablation decreases both colon tumor number and size and the degree of dysplasia (Raufman et al. 2008). Indeed, only low-grade adenomas are detected from $Apc^{min/+}$ M3 $mAChR^{-/-}$ mice while both low and high-grade adenomas are observed in $Apc^{min/+}$ M3 $mAChR^{+/+}$ mice (Boivin et al. 2003). Furthermore, M3 mAChR selective inhibitors have been proven to reduce the size of small cell lung cancer xenografts in nude mice (Song et al. 2007). Together, these findings indicate that M3 mAChR activation plays a strong role in intestinal tumor promotion by modulating key processes of carcinogenesis. This feature is particularly important in UC patients in which the expression of M3 mAChR is increased.

7.3 Intestinal microbiota

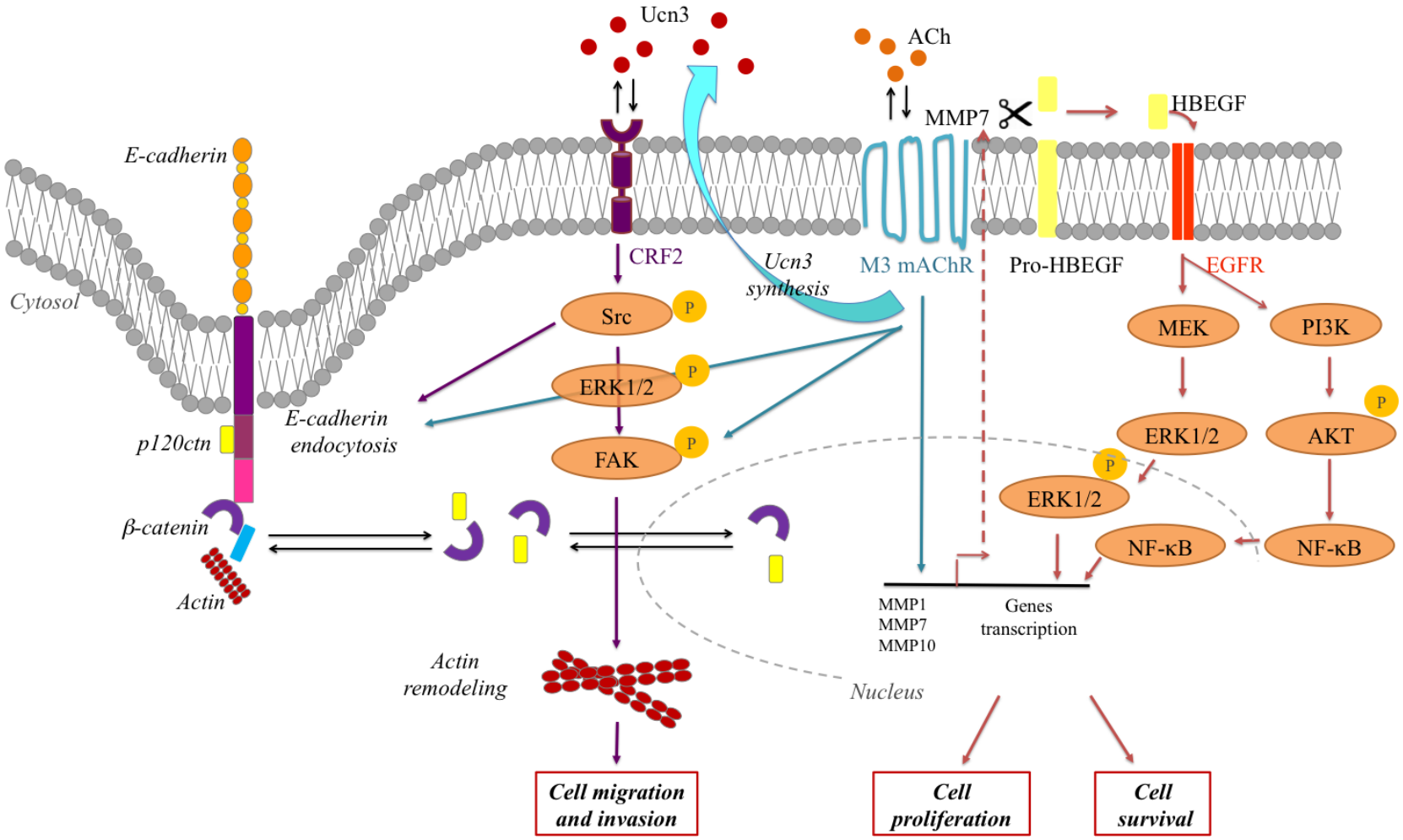


Figure 5: Model of CRF2 and mAChR crosstalk.
On one hand, ACh signals through muscarinic receptors (mAChR), which are express in "normal" and cancerous epithelial cells to induce MMP7 expression. Thus MMP7 catalyze the release of HBEGF from pro-HBEGF inducing the signaling of EGFR: The MAPK/ERK pathway regulates cell proliferation whereas the PI3K/Akt pathway regulates cell survival (Raufman's team findings). On the other hand, Activation of mAChR also induces Ucn3 release. This ligand binding to CRF2 leads to Src/FAK activation following by cell dissociation, E-cadherin endocytosis, migration and invasion.

The intestinal microbiota represents more than 1150 bacterial speciesthat, in the vast majority, are able to influenceIBD development. Each individual hosts approximately 160 species that are settled in the first two years of life and remain remarkably stable. The most represented phyla are: *Firmicutes*, 30.6-83% (*Clostridium, Ruminococcus, Eubacterium, Dorea, Peptostreptococcus, Peptococcus, Lactobacillus*);*Bacteroidetes*, 8-48% (*Bacteroides*); *Actinobacteria*, 0.7-16.7% (*Bifidobacterium*) and *Proteobacteria*, 0.1-26.6% (*Enterobacteriaceae*)(Serban 2014). Analysis of inflamed bowel segments from UC and CD patientsindicates a significant reduction in the biodiversity of fecal microbiota characterized by the absence of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and a large representation of *Enterobacteria*(CD) and E. *coli* (CD and UC) compared to healthy people.

7.3.1 Probiotics

The intestinal flora is a potential target for treatments aiming at decreasing the IBD inflammation and promote digestive repair(Pothoulakis 2009; Grimoud et al. 2010). For example, the non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* (*Sb*) is considered as an effective probiotic due to its resistance to the acidic pH found in the digestive tract(Bergogne-Bérézin 1995; Czerucka et al. 2007). It has been shown that *Sb* added to 5-ASA, an anti-inflammatory drug classically used in IBD treatment, allows remission of crohnpatients (Guslandi 2005). Indeed, it is suggested that *Sb* may modulate the inflammatory response of the host cell by secreting factors that facilitate the restoration of the intestinal epithelium(Canonici et al. 2011). In a model of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced acute colitis in mice, *Sb* protects the intestinal mucosa through inhibition of NFkB, leading to the decrease of pro-inflammatory cytokines(Dalmasso et al. 2006). *Sb* secretes an anti-inflammatory factor called the anti-inflammatory factor Saccharomyces (SAIF), which inhibits the production of IL-8 and reduces the response of the intestinal cells to pro-inflammatory cytokines (Sougioultzis et al. 2006; Lee et al. 2009). In addition to this anti-inflammatory effect, *Sb*may contribute to IEC differentiation. *In vivo*studies performed in ratsdemonstrated that the expression of *Sb* increases the expression of sucrose-isomaltase, an epithelial marker of IEC differentiation (Jahn et al. 1996). Finally, the supernatant of *Sb* contains “motogenic” factors that accelerate the intestinal restitution by increasing migration. This step results from an *Sb*-mediated increase α2β5 integrin affinity towards collagen type I and a competition with αvβ5 integrins to inhibit its interaction with vitronectin (Canonici et al. 2011; Canonici et al. 2012).

7.3.2 Microbiota and cancer

Structure and characteristics of microbiota are altered in the CRC and in pre-cancerous lesions; however, it is not clear whether these modifications are causal in tumor development or whether they are some of the consequences of tumorigenesis induction (Terg et al. 2008; Hartnett and Egan 2012). In CRC patients, microbiota modifications result ina decrease of*Bifidibacterium*, particularly *Bifidibacterium longum* and an increaseof *Proteobacteria*, *Dorea spp Coprococcus*. Surprisingly, the CRC is associated with an over-representation of comensal bacteria such as *Fusobacterium nucleatum* or *Coriobacteridae*. These are Gram$^-$ bacteria, which promote the development of the CRC or the acceleration of tumorigenesis in existing adenocarcinomas by releasing a virulent factor: FadA. FadA is an adhesion molecule that facilitates the attachment and invasion of microbes to epithelial cells (Han et al. 2005; Xu et al. 2007). Itincreasesthe paracellular transport by inducing the dissociation of intercellular junctions,thus facilitating the penetration of bacteria through the epithelium. This stepleads to the activation of the mucosal immune system (Fardini et al. 2011). On the other hand, FadA activates the β-catenin signaling and regulates the expression of genes such as transcription factors, stem cell markers and factors stimulating cell

proliferation (Rubinstein et al. 2013).It has been demonstrated that germ free mice develop fewer colitis than conventional animal. In addition, while the IL10$^{-/-}$mice treated with AOM developCAC in the presence of *Bacteroides Vulgaris*, the germ free animals do not develop tumors. Also, microbiota may also contribute to CRC via dysbiosis, a change in the distribution of metabolic activity(Terg et al. 2008; Hartnett and Egan 2012).

8. Adherens junctions as potential targets for colon cancer therapy

The lifetime risk of developing colorectal cancer in both men and women is about 1 in 20 (5.1%). Screening for colon cancer can be done by colonoscopy to find polyps, which may develop into cancer according to the duration of their persistence in the colon. Recurrence of colon cancer is common, with an estimated 40% of cases returning within 3–5 years of treatment. Since the use of 5-fluorouracil (5-FU) in 1962, the treatment of metastatic colorectal cancer has undergone major advances yielding significant improvements in survival over the last decade. These advances have evolved due to the benefits of routine utilization ofcombination chemotherapy with biologic therapy (for review (Kurkjian and Kummar). In this section we summarize some aspect of cancer therapy that focus on AJ (Figure 4).

8.1 Soluble cadherins as cancer biomarkers

To provide definitive information about the potential of a tumor to spread and relapse, and thus develop appropriate therapy, we need clinical variables such as the prognostic value of tumor size, involvement of lymph nodes, and metastatic spread (TNM) stage. However, additional molecular markers are needed because these clinical variables often fail. Circulating cancer biomarkers are useful in oncology because there are easy to collect, but there are few candidates according to the sensitivity and specificity of themolecules in the blood of cancer patients. Their source can be either the cancer cells themselvesor the associated stroma. Large molecules residing at the apical poleof epithelial cells constitute the currently used tumor markers and their presence in the circulation merely indicates the local loss of diffusion barriers, such as cell junctions and the basement membrane. Their plasmatic concentration reflects not only the tumor volume but also the extent of the barrier defect. The switch between E-cadherin and N-cadherin during the development of tumors cells towards invasive cells, associated to the remodeling of basal membrane in favor of invasion soluble N-cadherin(sN-Cad),is a promising tumor marker candidate(Wever et al. 2007). Recently, the presence of sN-CAD was detected in the serum of both healthy individuals and cancer patients, using a direct ELISA and immunoprecipitation assays. Furthermore a correlation was found between prostate-specific antigen (PSA) and sN-CAD(Derycke et al. 2006).

8.2 Chromatin modulating agents as target

Transcriptional repressors of E-cadherin may be considered as useful therapeutic targets for the prevention of local invasion and distant metastasis in GI malignancies. However, these transcriptional repressors of E-cadherin also have other cellular functions. Both Snail and Twist have been associated with anti-apoptotic functions and Snail has also been implicated in cell adhesion and migration. Furthermore, according to the grade and location of cancer cells,levels of E-cadherin can be very different. This parameter must be considered before startingany pharmacological treatment targeting regulators of E-cadherin expression or EMT. Chemotherapeutic compounds currently being used for the treatment of colorectal cancer include 5-FU, in combination with cisplatin analogs such as oxaliplatin, leucovorin or Irinotecan hydrochloride or drug combinations FOLFOX or FOLFIRI

(Kurkjian and Kummar). Only 25% of patients respond to 5-FU treatment; the addition of oxaliplatin can increase responses to 50%. Due to its rapid degradation and inconsistent GI absorption, 5-FUcan only be administered intravenously. These inadequacies have favored the search of analogs, which could be taken orally. While the addition of oxaliplatin to adjuvant 5-FUhas resulted in 3-year disease free survival rates of 76% to 78%, recurrent disease is still encountered in many patients such that new treatment options are critically needed(André et al. 2004; Kuebler et al. 2007).

8.2.1 DNA methyl transferase (DNMT) and colon cancer

The intricate interactions of EMT-inducing transcription factors and chromatin remodeling complexes broaden the therapeutic potentials of epigenetic drugs via DNA demethylating and histone deacetylase/demethylase inhibitors, which can act upon metastasis-related genes. The discovery of tumor suppressor genes methylation dates back for almost 30 years, however it is only recently that we have gained enough insight into this DNA modification to use it to our advantage. A great variety of nucleoside analogs such as 5-azacitidine, that require incorporation into RNA or DNA in order to inhibit DNMT has been developed as well as non-nucleoside analogs, which have demethylation capabilities and act by directly impairing the action of DNMT. RG108 is a small molecule with a significantly longer half-life in aqueous solution than 5-azacitidine, which hasbeen designed to the active site of DNMT1 and has concentration-dependent demethylating capability *in vitro* without cytoxicity(Brueckner et al. 2005; Stresemann et al. 2006). These drugs have been tested in various conditions of administration and frequency (intermittent versus continuous therapy) and were shown to have beneficial effects in leukemia (phase I, II, and III trials). In contrast, treatment with azacitidine in patients with solid tumors (prostate cancer) at the doses and schedules initially investigated did not demonstrate significant anti-tumor activity thus limiting its used in epithelial cancer such as colon cancer (for review (Kurkjian et al.; Subramaniam et al. 2014)). However, experiments aiming at modifying the level of DNMT1 were used astools to study the effect of DNA hypomethylation on intestinal tumorigenesis using the $APC^{Min/+}$ mouse model of intestinal tumors (Moser et al. 1990; Ichii et al. 1992; Laird et al. 1995). Treatment of $APC^{Min/+}$ mice with the 5-aza-2-deoxycytidine, significantly reduces tumor formation in the intestine, suggesting thatDNAmethylationmay play an important role during tumorigenesis (Laird et al. 1995). Moreover, overexpression of DNMT3B1 in the $APC^{Min/+}$ model enhanced colorectal carcinogenesis and caused tumor suppressor gene methylation (Linhart et al. 2007). Other studies have also shown that crossing $APC^{Min/+}$ mice with DNMT1 hypomorphic mice results in complete suppression ofmacroscopic intestinalneoplasia (Eads et al. 2002).At the molecular level, DNMT inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine was able to restore E-cadherin expression and revert cancer cells to the epithelial phenotype in various cancer cell lines (Yoshiura et al. 1995; Corn et al. 2000; Brock et al. 2003). In an *in vivo* model of breast cancer using cell-line MDA-MB-435S, this inhibitor restores E-cadherin expression and suppresses metastasis formation as well as primary growth, possibly through E-cadherin up-regulation (Nam et al. 2004).

Recently,epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the principal polyphenol in green tea has been describe to inhibit DNMT(Fang et al. 2003). Compared to azacitidine, this molecule has a lesser effect on DNA methylation and gene reactivation in various cell lines however, thanks to its tolerability and mild activity it may be used inlonger-term therapy(Chuang et al. 2005).

Even if therapy based on DNMT inhibitors are not used in colon cancer treatment yet, alterations such as methylation changes are found in fecal DNA of patients with colorectal cancer(Huang et al. 2007). In fact, of the three genes studied, over 96% of patients with cancer and 81% of patients with precancerous lesions had at least one methylated gene. In the normal individuals, only 1 patient of the 24 studied had a methylated gene. Hypermethylated p16 in circulating DNA of patients with colorectal cancer has been associated with advanced stage and has been found in patients

with recurrent disease (Zou et al. 2002; Nakayama et al. 2003). Epigenetic changes in the serum of patients already diagnosed with colorectal cancer provide a potential means of prognostication before and during therapy.

The association between aging and increased incidence of cancer has long been noted. Since alterations in the epigenome have been observed as a result of aging, the accumulation of genetic mutations is not only evoked as a precursor of the disease. As seen in patients already diagnosed with cancer, aging brings about a global hypomethylation with hypermethylation of specific gene promoters. A pertinent example is found in sporadic colorectal tumors with microsatellite instability(Nakagawa et al. 2001).

8.2.2 HDAC and colon cancer

According to the anti-inflammatory effect in the models of experimental colitis as well as the generally known anti-proliferative capacity of HDAC inhibitors, it has been suggested that HDAC inhibition would assume a strong tumor-preventing capacity in particular in cancer-associated-colitis (CAC), which differsfrom "non-inflammatory" colorectal cancer (Tarmin et al. 1995; Bird and Wolffe 1999). It has been demonstrated that the binding of 5-methyl-cytosine protein causes the recruitment of HDAC, suggesting a synergy between methylation and histone acetylation to regulate gene transcription (Jones et al. 1998; Cameron et al. 1999). These observations have stimulated clinical trials investigating the combination of a demethylating agent with an HDAC inhibitor. First trials, performed in myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia, showed an improvement in clinical activity with sequential administration of these two molecules(Yee KWL, Minden MD 2007).A number of clinical trials with other HDAC inhibitors have been tested and are also ongoing.

The anti-inflammatory potency of HDAC inhibitors was evaluated in DSS- and TNBS-inducedcolitis (Glauben et al. 2006). Oral administration of HDAC inhibitors of different classes (the suberoylanilide hydoxamic acids SAHA and ITF2357 as well as the short-chain fatty acid valproic acid) suppressed the inflammatory parameters in both models. This effect resulted in a suppression of the production of pro-inflammatory cytokines at the site of inflammation and a reduced histological inflammation score. SAHA is also capable of stimulating E-cadherin expression in endometrial carcinoma cell lines, which may represent another mechanism for the regulation of inflammation (Takai et al. 2004). This approach was also developed in two models of inflammation-associated cancerogenesis, mediated by chronic colitis, where tumors develop at the site of inflammation. The continuous treatment with either SAHA or ITF2357 attenuated both tumor growth and development in the AOM/DSS model, which is based on a single injection of the carcinogen AOM followed by induction of a chronic DSS colitis (Hegazi et al. 2003; Tanaka et al. 2003; Glauben et al. 2008). In the model of IL10knockout mice, animals spontaneously developed colitis, which progress to dysplasia and to infiltrating carcinomas with ageing. Again, treatment with HDAC inhibitors (ITF2357)was associated with an inhibition of tumorigenesis even after a previous treatment with celecoxib, an inhibitor of cyclooxygenase 2 which accelerates the progression of tumor development in this model (Hegazi et al. 2003). These findings demonstrate the efficacy of ITF2357 in the therapeutic model of inflammation-mediated carcinogenesis. Recent human data provide evidence that ITF2357 can be administered in doses sufficient to exert anti-inflammatory capacity suggesting thatthese compounds might in fact provide a future pharmacological strategy for patients suffering from IBD(Furlan et al.). The majority of currently available HDAC inhibitors are so-called pan-HDAC inhibitors, which inhibit the activity of a broad spectrum of HDACs (Bertrand 2010). One future goal will be to define the relevance of these inhibitors within the process of colorectal cancer.

IEC are integral players of intestinal homeostasis and barrier maintenance is under the influence of microbiome. In some circontances, the relationship between IEC and microbiota

becomes pathological and contributes to diseases such as IBD. The recent metagenomic analyses of microbiome changes have advanced our understanding of the modifiedmicrobiome in IBD, with principallyreduced representation of short chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate, SCFAs) producing strains, which correlates with a decreased SCFA levels in feces of children with IBD. SCFAs are microbial metabolites and dietary components.Among SCFAs, butyrate induces the highest acetylation and has been proposed to inhibit class I and class IIHDACs (Cousens et al. 1979).One possibility is that butyrate inhibits deacetylation, but not HDAC activity directly (Corfe 2012). The link between butyrate and E-cadherin up-regulation was first discovered in two breast cancer cell-lines, in which it induces cell-cycle arrest and increases cell–cell adhesion which are reversible upon addition of E-cadherin antibodies (Kondo et al. 1998). Subsequently, butyrate was found to up-regulate E-cadherin expression in colon cancer cells and in endometrial carcinoma cells (Barshishat et al. 2000; Masuda et al. 2000; Takai et al. 2004).In Caco-2 cells, butyrate provides an enhancement of barrier function by reducing paracellular permeability andfacilitating TJ assembly (Mariadason et al. 1997; Peng et al. 2009). These effects may result from the potential of SCFAs to alter epigenetic marks in epithelial cells (Wu et al. 2012). Hyperacetylation linked to the use of HDAC inhibitors is associated with amelioration of experimental colitis in mice(Glauben et al. 2006). Increased intake of SCFAs has the capacity to improve colitis disease parameters, possibly via the impact on HDAC activity (Maslowski et al. 2009). A clear impact of HDAC inhibitors is described on the generation of regulatory T cells, an effect that may contribute to the efficacy of HDAC inhibitors to colitis (Tao et al. 2007).

Butyrate can also regulate epithelial function such as cell proliferation, survival, and apoptosis (Wong et al. 2006; Wu et al. 2012). In particular butyrate represses p21, a potent cyclin-dependent kinase inhibitor that functions as a regulator of cell cycle progression at G1; an effect that can be overcome by overexpression of HDAC3 (Wilson et al. 2006; Wilson et al. 2008). Additionally, HDAC3 protein level was significantly up-regulated in a panel of human colon tumors compared with adjacent normal mucosa and in small intestinal adenomas derived from APC mutant mice epithelia, establishing a link between HDAC3 expression and intestinal cell transformation.

8.3EMT as a potential therapeutic target

EMT signatures can be exploited to enhance classical chemotherapy treatments. Furthermore, pharmacological therapies designed to inhibit these proteins will aim to prevent local and distant tumor invasion.

8.3.1 Cell adhesion molecules

Gain of N-cadherin expression is a typical example of the EMT signature and it has been linked with drug resistance (Zhang et al. 2007). According to the inhibitory effect of cyclic HAVD peptide on N-cadherin function in neuronal cells, Adherex (Durham, NC, US) developed a cyclic pentapeptide (ADH-1 or Exherin) as N-cadherin antagonist for use as an intravenous administered anticancer agent(Williams et al. 2000; Williams et al. 2002). ADH-1 has entered clinical testing and successfully passed phase I studies in patients with advanced solid tumors such as esophageal,non-small lung, renal cell and hepatocellular carcinomas expressing N-cadherin (Mariotti et al. 2007). Shingosine-1Phosphate (SP1) regulates N-cadherin dependent angiogenesis via the correct trafficking of N-cadherin to the plasma membrane (Visentin et al. 2006). A monoclonal antibody to SP1 substantially reduced tumor progression in murine models via anti-angiogenic and anti-tumorigenic

effects. Indeed the antibody blocks endothelial cell migration due to decreased N-cadherin shedding but also controls cancer cells proliferation through the down-regulation of β-catenin nuclear signaling.

EpCAM is also intensely used as a therapeutic target for antibody-based approachesin cancer with the strongest negative impact on prognosis. EpCAM signaling itself may be a target for therapeutic intervention. Whereas inhibitors of presenilins will not be specific for EpCAM, their use for cancer therapy may receive an additional development rationale by inhibiting EpCAM signaling. The protease inhibitors may increase levels of intact EpCAM, which serves as the extracellular anchor for anti-EpCAM antibodies with immunological activity. Another interest of EpCAMas therapeutic target lies in its expression incancer stem cells, an approach that is currently being assessed *in vitro*, in animal models.

8.3.2Growth factors and tyrosine kinase

Selective tyrosine kinase inhibitors are promising to treat cancers driven by activated tyrosine kinases such as Abl in chronic myelogenous leukemia, c-Kit in GI stromal tumors and EGFR in non-small cell lung cancer (NSCLC). It has been showed that EC-4 repeat of N-cadherin contains a sequence that associates with the HAV motif present in the FGFR leading to cell signaling (Williams et al. 2001; Suyama et al. 2002). Indeed, synthetic peptides containing the IDPVNGQ sequence and an antibody directed against the EC-4 domain of N-cadherin inhibited both N-cadherin and FGF-induced neurite out-growth and cancer cell migration (Kim et al. 2000a; Williams et al. 2001).

The development of targeted therapies has provided further gains on recent advances in chemotherapy approaches in colon carcinogenesis. Though the activities of these agents used alone were translated into substantial responses, their use in combination with chemotherapy resulted in the improvement ofresponse and survival rates. For the treatment of metastatic colorectal cancer, the Food and Drug Administration (FDA) hasapproved three targeted agents including bevacizumab, cetuximab, and panitumumab, however the treatment only concern patients with advanced colorectal cancer whose tumors express EGFR. In subsequent studies, no correlations were found between EGPR copy number and response to biotherapy (Sartore-Bianchi et al. 2007; Frattini et al. 2007; Cappuzzo et al. 2008). In addition, there is no difference in benefit for patients whose tumors express low versus high levels of the receptor (Cunningham et al. 2004; Chung et al. 2005). Even patients with negative staining for EGFR seem to demonstrate a response to the agent (Chung et al. 2005). The lack of reliably defined EGFR patterns, as well as the variability in resultscombined with the cost of the treatment have limited the routine applicability of this approach, even if this treatment results in important survival gains(Schrag 2004; Moroni et al. 2008). Furthermore, colorectal patients with a mutated KRAS donot respond to such inhibition of EGFR signaling (Amado et al. 2008). Indeed, in approximately 30% to 50% of colorectal cancers, KRAS can be constitutively activated such that inhibition of EGFR signaling will have no effect on KRAS activity, resulting in continued cancer cell growth (Downward 2003; Lièvre et al. 2006; Benvenuti et al. 2007; Schubbert et al. 2007). Based on these results, the European Committee for Medicinal Products for Human Use made the decision to require confirmation of wild-type KRAS status prior to initiation of panitumumab therapy (Baselga and Rosen 2008).

Src activity is increased in 80% of colon cancer patients, and this increase correlates with the progression from benign polyps to carcinoma and then to metastatic cancer (Cartwright et al. 1989; Cartwright et al. 1990; Talamonti et al. 1993; Aligayer et al. 2002).Development of metastasis constitutes the main cause of death in colon cancer; thus, their inhibition could reduce mortality. Src plays a key role in all steps of colon cancer metastasis via its downstream targets and its

overexpression in rat colon epithelial cells elicits invasive behavior by increasing cell adhesion, invasion, and migration(Pories et al. 1992). However in these conditions, Src doesnot modulate cell proliferation, suggesting that it may participate in late stage of carcinogenesis. Therefore, the inhibition of Src may facilitate the treatment of metastatic colon cancer to increase the survival rate. Increased activity of Src can not be attributed to an activating mutation of the Src geneonly, sincesuch mutation is found in 12% of patients only(Irby et al. 1999; Irby and Yeatman 2000). Src activity has also been associated to Src-induced drug resistance that occurs via the activation of p-glycoprotein (p-gp), a member of the ABC transporter familyimplicated in the transport of the drug (Griffiths et al. 2004; Kopetz et al. 2009). Tumor cells use p-gp to escape chemotherapeutic drug-induced death since an increase in the amount of p-gp leads to an increased efflux of drug and decreased bioavailability. An excellent recent review focuses on the role of Src in the metastasis of colon cancer and the problems of using Src inhibitors in a clinical setting(Chen et al. 2014). Many compounds have been developed to use as Src inhibitors, and their effectiveness for the treatment of colon cancer has been tested in cultured colon cancer cells and in xenograft model in nude mice(Golas et al. 2005). Some of them are in phase I and II clinical trials, such as dasatinib, AZD0530, and bosutinib and they are used alone or combined with other anticancer drugs, a condition that increases the effectiveness of Src inhibitors (Golubovskaya et al. 2003; Chen 2008; Jia et al. 2013). Curcumin, a natural product derived from a plant in the ginger family *Zingiberaceae*, is also an effective inhibitor of Src and FAK(Leu et al. 2003). Curcumin, which increases dasatinib-induced colon cancer apoptosis, may be used for the prevention or co-treatment of colon cancer.Recently, Src-targeted therapyhas been proven toweaken immune responses that are essential for the eradication of cancer cells, a parameter that may explain the unsatisfactory outcomes of clinical trials of Src inhibitors(Abram and Lowell 2008; Dougan and Dranoff 2009).Overcoming the problem of inhibiting Src in cancer cells while retaining immune system efficacy is the key to the successful application of Src-inhibition therapy.

TGF-β is a key inducer of EMT and stimulates N-cadherin dependent invasion of colon tumor-associated myofibroblasts (De Wever and Mareel 2003; De Wever et al. 2004). Pharmaceutical companies have avoided TGF-β antagonists, partly because they feared to affect its homeostatic roles in unaffected tissue. However, recent work highlights the clinically significant action of soluble TGF-β receptor antagonists, which bind and inactivate extracellular TGF-β, in cancer (Won et al. 1999; Muraoka et al. 2002; Yang et al. 2002). A specific, small organic TGF-βRI inhibitor (SB-431 542) attenuates cancer cell proliferation and motility in *in vitro* models (Inman et al. 2002; Laping et al. 2002; Matsuyama et al. 2003; Hjelmeland et al. 2004).

8.4 Stem cell as therapeutic target

Cancer tissues are composed of several heterogeneous cancer cells among which a small part is supposed to have higher tumor-initiating ability. These higher tumorigenic populations are named “cancer stem cells (CSCs)” or “cancer initiating cells (CICs)” (Giannakis et al. 2006; O'Brien et al. 2007).More recently, the cancer stem-cell concept is gaining importance, because it suggests new approaches to anti-cancer therapies (Todaro et al. 2010; Schepers and Clevers 2012). CSCs/CICs are defined as small population of cancer cells which have: i) higher tumor-initiating ability, ii) self-renewal, and ii) differentiation(Dalerba et al. 2007). CSCs/CICs have been reported to be resistant to the majority of therapy used in colorectal cancer(Visvader and Lindeman 2008); thus, new treatmentstargetingspecifically CSC/CIC must be developed. Potential markers of colorectal cancer stem cells have been proposed as therapeutic target for colon cancer, including CD133, CD166, CD24, CD44, ALDH1, LGR5, and DCLK1(Dalerba et al. 2007; May et al. 2008; Hirsch et al. 2014). In this way, Nakanishi *et al* ., demonstrated that doublecortin and CaM kinase-like-1 (DCLK1) distinguishes

between tumor and normal stem cells in the intestine and that specific ablation of $DCLK1^{+}$stem cells resulted in a marked regression of polyps without apparent damage to the normal intestine(May et al. 2008; Nakanishi et al. 2013).

8.5 Vitamin D and colorectal cancer

The most active metabolite of vitamin D3, 1α25 dihydroxyvitamin D3 ($1,25(OH)_2D_3$, calcitriol) is a pleotropic hormone with wide regulatory actions, which exerts its action by binding to and activating the vitamin D receptor (VDR), a member of the nuclear steroid-thyroid-retinoid-receptor super-family of transcription factors and regulates gene expression in a ligand-dependent manner (Deeb et al. 2007; Thorne and Campbell 2008). According to its classical role as a regulator of calcium and phosphate homeostasis and bone mineralization, this hormone has been first shown to induce differentiation inmyeloid leukemia cells and inhibit the growth of melanoma cells, thus stimulating the interest of cancer research(Colston et al. 1981; Abe et al. 1981). It is proved now that calcitriol, the active form of vitamin D,regulates multiplesignaling pathways involved in proliferation, apoptosis, differentiation, inflammation, invasion, angiogenesis and metastasis. Pioneer study for the role of vitamin D in CRC comes from Frank and Cedric Garland who proposed an inverse correlation between solar radiation and CRC mortality probably due to vitamin D synthesis(Garland & Garland, 1980). To date, numerous epidemiologic and experimental studies support that CRC mortality was inversely related tocalcitrioland its presence in serum(Platz et al. 2000; Wu et al. 2007; Freedman et al. 2007; Jenab et al. 2010; Gandini et al. 2011; Giovannucci 2013). Recent reviews describe in more details the pleotropic roles of vitamin D in cancers (Pereira et al. 2012; Feldman et al. 2014). In this section we just summarize the role of vitamin D3 on AJ proteins in relation to CRC.

According to the differentiation process,calcitriol increases the expression and/or activity of several brush border enzymes, such as alkaline phosphatase and sucrose-isomaltase, and enhances the formation of microvilli (Brehier and Thomasset 1988; Giuliano et al. 1991; Halline et al. 1994; Díaz et al. 2000). In addition, it increases the expression of several components of cell adhesion structures, actin cytoskeleton and intermediate filaments that are essential for the maintenance of the epithelial phenotype: i) occludin, zonula occludens (ZO)-1 and -2, and claudin-2 and -12 in TJ(Palmer 2001; Fujita et al. 2008); ii) E-cadherin in AJand sequestration of β-catenin at the membrane (Palmer 2001); vinculin, filamin A and keratin-13(Palmer 2001; Pálmer et al. 2003). Finally calcitriol regulates several genes related to protein degradation machinery, such as proteases and their inhibitors and component of the ubiquitin-proteasome system, all may control thestability of E-cadherin at the membrane (Álvarez-Díaz et al. 2010).

Calcitriol actions in colon cancer cells inhibit β-catenin transcriptional activity, thereby countering aberrant activation of Wnt/β-catenin signaling, which is the most common alteration in sporadic CRC. Indeed, calcitriol can inhibit β-catenin signaling pathway by: i) increasing the amount of VDR bound to β-catenin, thus reducing its interaction with TCF/Lef transcription factor and leading to the repression of its target genes (Palmer 2001; Shah et al. 2006; Egan et al. 2010); ii) inducing β-catenin export from the nucleus linked to the accumulation of E-cadherin at the membrane (Palmer 2001); iii) inducing DKK1, an extracellular Wnt inhibitor (Aguilera et al. 2007); iv) regulating RhoA-ROK-p38 MAPK-MSK pathway which also increases E-cadherin expression(Ordóñez-Morán et al. 2008; Ordóñez-Morán et al. 2010).

CRC responsiveness to calcitriol depends on the expression of VDR. VDR expression by normal and certain tumor epithelial cells is associated with high degree of cell differentiation whereas its expression decreases in advanced stages of tumors(González-Sancho et al.; Shabahang et al. 1993; Sheinin et al. 2000; Cross et al. 2001; Modica et al. 2010). This downregulation is a cause of failure of

the therapy using calcitriol or its analogs. Furthermore, Snails transcription factor represses VDRexpression thereby reducing the anti-cancer effect of calcitriol(Pálmer et al. 2004; Larriba et al. 2007). Increase expression of Snail in human colon tumors (60%) is associated with a loss of responsiveness to calciriol(Larriba et al. 2009).Post-transcriptional events participate in the regulation of VDR expression. It has been shown that miR-27b and miR-298 reduce levels of VDR in LS-180 colon cancer cells (Pan et al. 2009). miR-125b, which is overexpressed in colon cancer metastases, also down-regulates VDR expression (Baffa et al. 2009). In contrast, miR-22, which is a target of calcitriol *in vivo,* is required for the anti-proliferative and anti-migratory effect of calcitriol in colon cancer cells (Alvarez-Díaz et al. 2012). miR-122 expression is lower in tumor than in matched normal tissues in 78% of CRC patients and correlate with VDR RNA expression. Therefore the over-expression of miRNAs that target VDR may constitute of novel strategy for CRC. Finally, co-treatmentwith HDAC inhibitors and DNMT reverses the resistance to the anti-proliferative effect of calcitriol in CRC (Abedin et al.). A phenomenon probably due to butyrate-induced VDR over-expression (Gaschott et al. 2002; Gaschott and Stein 2003).

Multiple cell culture and animals models support a protective and therapeutic action of Vitamin D against CRC, however data from human trials are not totally clear yet. Indeed, several studies have shown that calcitriol or analogs reduce the growth of colorectal xenografts (for review (Ordonez-Moran et al. 2005; Deeb et al. 2007; Kang et al. 2011)). They also reduce tumor load in $APC^{min/+}$ mice and increase the expression of E-cadherin, inhibitthat of myc and reduceβ-catenin nuclear levels in the small intestine and colon of $APC^{min/+}$ mice(Xu et al. 2010).

9. Conclusion

Despite their primordial structural role in stabilizing intercellular cohesion and overall epithelial tissue architecture, AJ are far from being static features. The several inputs responsible for the regulation of AJ presented in this chapter highlight their rather dynamic nature, which is of high importance, both during morphogenesis, physiological epithelial renewal in adults, as well as in pathological inflammatory or cancerous diseases. This explains why AJ proteins studies are central to the field of epithelium biology and biomedecine. However, increasing our knowledge of the cadhesome complex structure, regulation and functions is still a “work in progress”. From the “core” cadherin-catenin complexes to the myriad of cytoplasmic interactors and regulators, the complexity and the diversity of AJ signaling makes it a fascinating and rich domain of research.This complexity offers a great variety of therapeutic strategies and no doubt that the field will take advantage of the fantastic development of large scales “omics” approaches combined with more precisely aimed structural, biophysical and classical animal biology technics.

References

Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. (1981) Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Proc Natl Acad Sci 78:4990–4994. doi: 10.1073/pnas.78.8.4990

Abe K, Takeichi M (2008) EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. Proc Natl Acad Sci U S A 105:13–9. doi: 10.1073/pnas.0710504105

Abedin SA, Banwell CM, Colston KW, et al. Epigenetic corruption of VDR signalling in malignancy. Anticancer Res 26:2557–66.

Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J 16:3797–804. doi: 10.1093/emboj/16.13.3797

Aberle H, Butz S, Stappert J, et al. (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. J Cell Sci 107 (Pt 1:3655–63.

Aberle H, Schwartz H, Kemler R, Hoschuetzky H (1996) Single Amino Acid Substitutions in Proteins of the armadillo Gene Family Abolish Their Binding to -Catenin Single Amino Acid Substitutions in Proteins of the armadillo Gene Family Abolish Their Binding to ␣-Catenin *. J. Biol. Chem.

Abram CL, Lowell CA (2008) The diverse functions of Src family kinases in macrophages. Front Biosci 13:4426–50.

Aguilera O, Peña C, García JM, et al. (2007) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. Carcinogenesis 28:1877–84. doi: 10.1093/carcin/bgm094

Aho S, Rothenberger K, Uitto J (1999) Human p120 ctn Catenin : Tissue-Specific Expression of Isoforms and Molecular Interactions With BP180 / Type XVII Collagen. J Cell Biochem 399:390–399.

Akhtar N, Hotchin NA (2001) RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. Mol Biol Cell 12:847–862.

Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, et al. (2008) The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 99:1476–83. doi: 10.1038/sj.bjc.6604713

Alemà S, Salvatore AM (2007) p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue. Biochim Biophys Acta 1773:47–58. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.06.001

Alexander S, Koehl GE, Hirschberg M, et al. (2008) Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. Histochem Cell Biol 130:1147–54. doi: 10.1007/s00418-008-0529-1

Aligayer H, Boyd DD, Heiss MM, et al. (2002) Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. Cancer 94:344–51. doi: 10.1002/cncr.10221

Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell 117:699–711. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.018

Álvarez-Díaz S, Larriba MJ, López-Otín C, Muñoz A (2010) Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer. Cell Cycle 9:32–37. doi: 10.4161/cc.9.1.10266

Alvarez-Díaz S, Valle N, Ferrer-Mayorga G, et al. (2012) MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. Hum Mol Genet 21:2157–65. doi: 10.1093/hmg/dds031

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26:1626–34. doi: 10.1200/JCO.2007.14.7116

Aman A, Piotrowski T (2008) Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression. Dev Cell 15:749–61. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.002

Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, et al. (2000) Inhibition of RhoA by p120 catenin. Nat Cell Biol 2:637–44. doi: 10.1038/35023588

Anastasiadis PZ, Reynolds a B (2000) The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. J Cell Sci 113 (Pt 8:1319–34.

André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. N Engl J Med 350:2343–51. doi: 10.1056/NEJMoa032709

Androulidaki A, Dermitzaki E, Venihaki M, et al. (2009) Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. Mol Cancer 8:30. doi: 10.1186/1476-4598-8-30

Angres B, Kim L, Jung R, et al. (2001) LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development. Dev Dyn 221:182–93. doi: 10.1002/dvdy.1146

Ardawatia V V, Masià-Balagué M, Krakstad BF, et al. (2011) Gα(12) binds to the N-terminal regulatory domain of p120(ctn), and downregulates p120(ctn) tyrosine phosphorylation induced by Src family kinases via a RhoA independent mechanism. Exp Cell Res 317:293–306. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.10.017

Arranz A, Venihaki M, Mol B, et al. (2010) The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. Mol Cancer 9:261. doi: 10.1186/1476-4598-9-261

Aumailley M, Krieg T (1996) Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. J Invest Dermatol 106:209–214.

Avizienyte E, Fincham VJ, Brunton VG, Frame MC (2004) Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. Mol Biol Cell 15:2794–803. doi: 10.1091/mbc.E03-12-0879

Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, et al. (2002) Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. Nat Cell Biol 4:632–8. doi: 10.1038/ncb829

Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, et al. (2004) Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell 116:457–466. doi: S009286740400114X [pii]

Baffa R, Fassan M, Volinia S, et al. (2009) MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. J Pathol 219:214–21. doi: 10.1002/path.2586

Baigent SM (2001) Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. Peptides 22:809–20.

Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, et al. (2001) Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2381–6. doi: 10.1073/pnas.041603398

Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44:525–57. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410

Balsamo J, Leung T, Ernst H, et al. (1996) Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. J Cell Biol 134:801–13.

Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, et al. (1998) Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. Mol Cell Biol 18:4833–43.

Bao S, Tang F, Li X, et al. (2009) Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. Nature 461:1292–5. doi: 10.1038/nature08534

Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, et al. (2002) Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. Nature 419:162–7. doi: 10.1038/nature01045

Barshishat M, Polak-Charcon S, Schwartz B (2000) Butyrate regulates E-cadherin transcription, isoform expression and intracellular position in colon cancer cells. Br J Cancer 82:195–203. doi: 10.1054/bjoc.1999.0899

Bartolmäs T, Hirschfeld-Ihlow C, Jonas S, et al. (2012) LI-cadherin cis-dimerizes in the plasma membrane Ca(2+) independently and forms highly dynamic trans-contacts. Cell Mol Life Sci 69:3851–62. doi: 10.1007/s00018-012-1053-y

Bartolomé RA, Barderas R, Torres S, et al. (2014) Cadherin-17 interacts with α2β1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis. Oncogene 33:1658–69. doi: 10.1038/onc.2013.117

Baselga J, Rosen N (2008) Determinants of RASistance to anti-epidermal growth factor receptor agents. J Clin Oncol 26:1582–4. doi: 10.1200/JCO.2007.15.3700

Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, et al. (1999) Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. J Biol Chem 274:29819–25.

Bates IR, Wiseman PW, Hanrahan JW (2006) Investigating membrane protein dynamics in living cells. Biochem Cell Biol 84:825–31. doi: 10.1139/o06-189

Batistatou A, Charalabopoulos AK, Scopa CD, et al. (2006) Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. Virchows Arch 448:763–7. doi: 10.1007/s00428-006-0183-8

Batlle E, Bacani J, Begthel H, et al. (2005) EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. Nature 435:1126–30. doi: 10.1038/nature03626

Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, et al. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. Cell 111:251–63.

Batlle E, Sancho E, Francí C, et al. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol 2:84–9. doi: 10.1038/35000034

Baumgartner W (2013) Possible roles of LI-Cadherin in the formation and maintenance of the intestinal epithelial barrier. Tissue barriers 1:e23815. doi: 10.4161/tisb.23815

Baumgartner W, Wendeler MW, Weth A, et al. (2008) Heterotypic trans-interaction of LI- and E-cadherin and their localization in plasmalemmal microdomains. J Mol Biol 378:44–54. doi: 10.1016/j.jmb.2008.02.023

Beaulieu JF (1999) Integrins and human intestinal cell functions. Front Biosci 4:D310–21.

Behrens J (2005) The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. Biochem Soc Trans 33:672–5. doi: 10.1042/BST0330672

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, et al. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature 382:638–42. doi: 10.1038/382638a0

Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, et al. (2005) Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. Cancer Res 65:10938–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1947

Belo A, Cheng K, Chahdi A, et al. (2011) Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300:G749–60. doi: 10.1152/ajpgi.00306.2010

Bender CM, Pao MM, Jones PA (1998) Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2″-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. Cancer Res 58:95–101.

Benjamin JM, Kwiatkowski A V, Yang C, et al. (2010) AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. J Cell Biol 189:339–52. doi: 10.1083/jcb.200910041

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res 67:2643–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4158

Bergogne-Bérézin E (1995) [Ecologic impact of antibiotherapy. Role of substitution microorganisms in the control of antibiotic-related diarrhea and colitis]. Presse Med 24:145–148,151–152,155–156.

Berndorff D, Gessner R, Kreft B, et al. (1994) Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. J Cell Biol 125:1353–69.

Bertet C, Sulak L, Lecuit T (2004) Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. Nature 429:667–71. doi: 10.1038/nature02590

Bertocchi C, Vaman Rao M, Zaidel-Bar R (2012) Regulation of adherens junction dynamics by phosphorylation switches. J Signal Transduct 2012:125295. doi: 10.1155/2012/125295

Bertrand P (2010) Inside HDAC with HDAC inhibitors. Eur J Med Chem 45:2095–116. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.02.030

Berx G, van Roy F (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 1:a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129

Bird AP, Wolffe AP (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. Cell 99:451–4.

Black PH (2002) Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. Brain Behav Immun 16:622–53.

Blanchoin L, Michelot A (2012) Actin cytoskeleton: a team effort during actin assembly. Curr Biol 22:R643–5. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.026
Block J, Breitsprecher D, Kühn S, et al. (2012) FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. Curr Biol 22:1005–12. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.064
Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, et al. (2002) C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. Science 296:1308–13. doi: 10.1126/science.1071559
Böhm H, Brinkmann V, Drab M, et al. (1997) Mammalian homologues of C. elegans PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. Curr Biol 7:603–6.
Boivin GP, Washington K, Yang K, et al. (2003) Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. Gastroenterology 124:762–77. doi: 10.1053/gast.2003.50094
Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, et al. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. J Cell Sci 116:499–511.
Bonnomet A, Polette M, Strumane K, et al. (2008) The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression. Oncogene 27:3692–9. doi: 10.1038/sj.onc.1211035
Boucher M-J, Laprise P, Rivard N (2005) Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells. J Cell Physiol 202:178–90. doi: 10.1002/jcp.20104
Bouma G, Strober W (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 3:521–33. doi: 10.1038/nri1132
Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. Cells Tissues Organs 179:56–65. doi: 10.1159/000084509
Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10356–61. doi: 10.1073/pnas.171610498
Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, et al. (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. Cancer Res 68:7846–54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1942
Brady-Kalnay SM, Mourton T, Nixon JP, et al. (1998) Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo. J Cell Biol 141:287–296.
Braga VM, Yap AS (2005) The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. Curr Opin Cell Biol 17:466–74. doi: 10.1016/j.ceb.2005.08.012
Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L (2012) Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. Trends Cell Biol 22:299–310. doi: 10.1016/j.tcb.2012.03.004
Brehier A, Thomasset M (1988) Human colon cell line HT-29: Characterisation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and induction of differentiation by the hormone. J Steroid Biochem 29:265–270. doi: 10.1016/0022-4731(88)90275-0
Brieher WM, Yap AS (2013) Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). Curr Opin Cell Biol 25:39–46. doi: 10.1016/j.ceb.2012.10.010
Brock M V, Gou M, Akiyama Y, et al. (2003) Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 9:2912–9.
Brown J (1990) The Muscarinic Receptors. New York Humana
Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, et al. (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. Cancer Res 65:6305–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2957
Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, et al. (2005) Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. FASEB J 19:923–33. doi: 10.1096/fj.04-3260com
Bryant DM, Kerr MC, Hammond LA, et al. (2007) EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. J Cell Sci 120:1818–1828. doi: 10.1242/jcs.000653
Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N, Johnson GL (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. J Biol Chem 270:24631–4.
Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, et al. (1994) A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol 14:209–11.
Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. EMBO Rep 9:582–9. doi: 10.1038/embor.2008.74
Cadigan KM, Peifer M (2009) Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. Cold Spring Harb Perspect Biol 1:a002881. doi: 10.1101/cshperspect.a002881
Cai D, Chen S-C, Prasad M, et al. (2014) Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. Cell 157:1146–59. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.045
Calandrella SO, Barrett KE, Keely SJ (2005) Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates muscarinic stimulation of focal adhesion kinase in intestinal epithelial cells. J Cell Physiol 203:103–10. doi: 10.1002/jcp.20190
Calautti E, Cabodi S, Stein PL, et al. (1998) Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. J Cell Biol 141:1449–65.
Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, et al. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet 21:103–7. doi: 10.1038/5047
Cameron HL, Perdue MH (2007) Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. Neurogastroenterol Motil 19:47–56. doi: 10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x
Campellone KG, Welch MD (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nat Rev Mol Cell Biol 11:237–51. doi: 10.1038/nrm2867
Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG (2013) E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. J Cell Sci 126:393–401. doi: 10.1242/jcs.100115
Canel M, Serrels A, Miller D, et al. (2010) Quantitative in vivo imaging of the effects of inhibiting integrin signaling via Src and FAK on cancer cell movement: effects on E-cadherin dynamics. Cancer Res 70:9413–22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1454

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. (2000a) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol 2:76–83. doi: 10.1038/35000025
Cano A, Pérez-moreno MA, Rodrigo I, et al. (2000b) The transcription factor Snail controls epithelial – mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. 2:
Canonici A, Pellegrino E, Siret C, et al. (2012) Saccharomyces boulardii improves intestinal epithelial cell restitution by inhibiting αvβ5 integrin activation state. PLoS One 7:e45047. doi: 10.1371/journal.pone.0045047
Canonici A, Siret C, Pellegrino E, et al. (2011) Saccharomyces boulardii improves intestinal cell restitution through activation of the α2β1 integrin collagen receptor. PLoS One 6:e18427. doi: 10.1371/journal.pone.0018427
Canonici A, Steelant W, Rigot V, et al. (2008) Insulin-like growth factor-I receptor, E-cadherin and alpha v integrin form a dynamic complex under the control of alpha-catenin. Int J Cancer 122:572–82. doi: 10.1002/ijc.23164
Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, et al. (2008) EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. Ann Oncol 19:717–23. doi: 10.1093/annonc/mdm492
Carroll KM, Wong TT, Drabik DL, Chang EB (1988) Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. Am J Physiol 254:G355–60.
Cartwright CA, Kamps MP, Meisler AI, et al. (1989) pp60c-src activation in human colon carcinoma. J Clin Invest 83:2025–33. doi: 10.1172/JCI114113
Cartwright CA, Meisler AI, Eckhart W (1990) Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 87:558–62.
Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, et al. (1996) Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. Am J Physiol 271:G884–92.
Castaño J, Solanas G, Casagolda D, et al. (2007) Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. Mol Cell Biol 27:1745–57. doi: 10.1128/MCB.01974-06
Céspedes MV, Larriba MJ, Pavón MA, et al. (2010) Site-dependent E-cadherin cleavage and nuclear translocation in a metastatic colorectal cancer model. Am J Pathol 177:2067–79. doi: 10.2353/ajpath.2010.100079
Chagnon MJ, Uetani N, Tremblay ML (2004) Functional significance of the LAR receptor protein tyrosine phosphatase family in development and diseases. Biochem Cell Biol 82:664–675. doi: 10.1139/o04-120
Chalhoub N, Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. Annu Rev Pathol 4:127–150. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311
Chan G, Kalaitzidis D, Neel BG (2008) The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. Cancer Metastasis Rev 27:179–192. doi: 10.1007/s10555-008-9126-y
Chang J, Adams MR, Clifton MS, et al. (2011) Urocortin 1 modulates immunosignaling in a rat model of colitis via corticotropin-releasing factor receptor 2. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300:G884–94. doi: 10.1152/ajpgi.00319.2010
Chartier NT, Lainé M, Gout S, et al. (2006) Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. J Cell Sci 119:31–46. doi: 10.1242/jcs.02698
Chartier NT, Lainé MG, Ducarouge B, et al. (2011) Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. Exp Cell Res 317:1422–36. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.03.009
Chartier NT, Oddou CI, Lainé MG, et al. (2007) Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. Cancer Res 67:9781–90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0233
Chatzaki E, Lambropoulou M, Constantinidis TC, et al. (2006) Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. J Cell Physiol 209:905–11. doi: 10.1002/jcp.20792
Chem JB, Peinado H, Quintanilla M, Cano A (2003) Molecular Basis of Cell and Developmental Biology : Transforming Growth Factor β -1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines : MECHANISMS FOR TRANSITIONS Hector Peinado , Miguel Quintanilla and Transforming Growth Factor ␤ -1 Induces Sn. doi: 10.1074/jbc.M211304200
Chen H, Paradies NE, Fedor-Chaiken M, Brackenbury R (1997) E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. J Cell Sci 110 (Pt 3:345–56.
Chen J (2008) Is Src the key to understanding metastasis and developing new treatments for colon cancer? Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 5:306–7. doi: 10.1038/ncpgasthep1141
Chen J, Elfiky A, Han M, et al. (2014) The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications. Clin Colorectal Cancer 13:5–13. doi: 10.1016/j.clcc.2013.10.003
Chen J, Liu J, Yang J, et al. (2011) BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. Cell Res 21:205–12. doi: 10.1038/cr.2010.172
Chen T, Yuan D, Wei B, et al. (2010) E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. Stem Cells 28:1315–25. doi: 10.1002/stem.456
Chen X, Macara IG (2005) Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. Nat Cell Biol 7:262–9. doi: 10.1038/ncb1226
Chen Y, Dubé CM, Rice CJ, Baram TZ (2008) Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. J Neurosci 28:2903–11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0225-08.2008
Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ (1999) Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. J Cell Biol 144:687–99.
Cheng K, Raufman J-P (2005) Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. Biochem Pharmacol 70:1035–47. doi: 10.1016/j.bcp.2005.07.023
Cheng K, Samimi R, Xie G, et al. (2008) Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295:G591–7. doi: 10.1152/ajpgi.00055.2008
Cheng K, Xie G, Raufman J-P (2007) Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholyltaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. Biochem Pharmacol 73:1001–12. doi: 10.1016/j.bcp.2006.11.028

Chetty R, Serra S (2008) Nuclear E-cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. Adv Anat Pathol 15:234–40. doi: 10.1097/PAP.0b013e31817bf566
Cheung LWT, Leung PCK, Wong AST (2010) Cadherin switching and activation of p120 catenin signaling are mediators of gonadotropin-releasing hormone to promote tumor cell migration and invasion in ovarian cancer. Oncogene 29:2427–40. doi: 10.1038/onc.2009.523
Chien Y-H, Jiang N, Li F, et al. (2008) Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. J Biol Chem 283:1848–1856. doi: 10.1074/jbc.M708044200
Ching-Wen L, Shih-Han K, Pan-Chyr Y (2014) The MiRNAs and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers. Curr. Pharm. Des.
Chitaev N a, Averbakh a Z, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM (1998) Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex. J Cell Sci 111 (Pt 1:1941–9.
Chiu S-T, Chang K-J, Ting C-H, et al. (2009) Over-expression of EphB3 enhances cell-cell contacts and suppresses tumor growth in HT-29 human colon cancer cells. Carcinogenesis 30:1475–86. doi: 10.1093/carcin/bgp133
Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res 66:8319–26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410
Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, et al. (2005) Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2″-deoxycytidine. Mol Cancer Ther 4:1515–20. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0172
Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. (2005) Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. J Clin Oncol 23:1803–10. doi: 10.1200/JCO.2005.08.037
Chung Y, Lam AKY, Luk JM, et al. (2007) Altered E-cadherin expression and p120 catenin localization in esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 14:3260–7. doi: 10.1245/s10434-007-9511-8
Cifuentes-Diaz C, Nicolet M, Goudou D, et al. (1994) N-cadherin expression in developing, adult and denervated chicken neuromuscular system: accumulations at both the neuromuscular junction and the node of Ranvier. Development 120:1–11.
Ciruna B, Rossant J (2001) Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. 1:37–49.
Clayburgh DR, Shen L, Turner JR (2004) A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. Lab Invest 84:282–91. doi: 10.1038/labinvest.3700050
Clevers H, Batlle E (2006) EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. Cancer Res 66:2–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3849
Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell 149:1192–205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012
Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, Müsch A (2004) Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. J Cell Biol 164:717–27. doi: 10.1083/jcb.200308104
Colston K, Colston MJ, Feldman D (1981) 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. Endocrinology 108:1083–6. doi: 10.1210/endo-108-3-1083
Conacci-sorrell M, Simcha I, Ben-yedidia T, et al. (2003) Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin – cadherin interactions : the roles. 163:847–857. doi: 10.1083/jcb.200308162
Corfe BM (2012) Hypothesis: butyrate is not an HDAC inhibitor, but a product inhibitor of deacetylation. Mol Biosyst 8:1609–12. doi: 10.1039/c2mb25028d
Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, et al. (2000) E-cadherin expression is silenced by 5″ CpG island methylation in acute leukemia. Clin Cancer Res 6:4243–8.
Cortina C, Palomo-Ponce S, Iglesias M, et al. (2007) EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. Nat Genet 39:1376–83. doi: 10.1038/ng.2007.11
Cousens LS, Gallwitz D, Alberts BM (1979) Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. J Biol Chem 254:1716–23.
Covington MD, Burghardt RC, Parrish AR (2006) Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells requires MT1-MMP (MMP-14). Am J Physiol Renal Physiol 290:F43–51. doi: 10.1152/ajprenal.00179.2005
Cross HS, Bareis P, Hofer H, et al. (2001) 25-Hydroxyvitamin D3-1α-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. Steroids 66:287–292. doi: 10.1016/S0039-128X(00)00153-7
Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 351:337–45. doi: 10.1056/NEJMoa033025
Czerucka D, Piche T, Rampal P (2007) Review article: yeast as probiotics -- Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol Ther 26:767–78. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x
Dadke S, Kusari A, Kusari J (2001) Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. Mol Cell Biochem 221:147–54.
Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, et al. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104:10158–63. doi: 10.1073/pnas.0703478104
Dalmasso G, Cottrez F, Imbert V, et al. (2006) Saccharomyces boulardii inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. Gastroenterology 131:1812–25. doi: 10.1053/j.gastro.2006.10.001
Daly AJ, McIlreavey L, Irwin CR (2008) Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts--implications for invasion of oral cancer. Oral Oncol 44:646–51. doi: 10.1016/j.oraloncology.2007.08.012
Damsky CH, Richa J, Solter D, et al. (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. Cell 34:455–66.
Daniel JM (2007) Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. Biochim Biophys Acta 1773:59–68. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.052
Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. Mol Cell Biol 19:3614–23.
Daniel JM, Reynolds AB (1995) The Tyrosine Kinase Substrate p120 cas Binds Directly to E-Cadherin but Not to the Adenomatous Polyposis Coli Protein or ␣-Catenin. 15:4819–4824.

Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, et al. (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. Nucleic Acids Res 30:2911–9.
Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, et al. (2001) Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the beta-catenin pathway. Mol Cell Biol 21:5857–68.
Darwanto A, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S (2003) MeCP2 and promoter methylation cooperatively regulate E-cadherin gene expression in colorectal carcinoma. Cancer Sci 94:442–7.
Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, et al. (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. Oncogene 31:2062–74. doi: 10.1038/onc.2011.383
Davies G, Jiang WG, Mason MD (2001) Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. Clin Cancer Res 7:3289–97.
De Beco S, Amblard F, Coscoy S (2012) New insights into the regulation of E-cadherin distribution by endocytosis. Int Rev Cell Mol Biol 295:63–108. doi: 10.1016/B978-0-12-394306-4.00008-3
De Craene B, Berx G (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. Nat Rev Cancer 13:97–110. doi: 10.1038/nrc3447
De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J Pathol 200:429–47. doi: 10.1002/path.1398
De Wever O, Nguyen Q-D, Van Hoorde L, et al. (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. FASEB J 18:1016–8. doi: 10.1096/fj.03-1110fje
Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer 7:684–700. doi: 10.1038/nrc2196
Del Valle-Pérez B, Casagolda D, Lugilde E, et al. (2011) Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1ε-dependent phosphorylation of p120-catenin. J Cell Sci 124:2298–309. doi: 10.1242/jcs.082693
Delva E, Kowalczyk AP (2009) Regulation of cadherin trafficking. Traffic 10:259–67. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00862.x
Demaude J, Levêque M, Chaumaz G, et al. (2009) Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. Life Sci 84:847–52. doi: 10.1016/j.lfs.2009.03.016
Denzel S, Maetzel D, Mack B, et al. (2009) Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. BMC Cancer 9:402. doi: 10.1186/1471-2407-9-402
Derycke L, De Wever O, Stove V, et al. (2006) Soluble N-cadherin in human biological fluids. Int J Cancer 119:2895–900. doi: 10.1002/ijc.22219
Díaz GD, Paraskeva C, Thomas MG, et al. (2000) Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. Cancer Res 60:2304–12.
Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A (2014) Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. Cancer Manag Res 6:205–16. doi: 10.2147/CMAR.S38156
Díaz-Martín J, Díaz-López A, Moreno-Bueno G, et al. (2014) A core microRNA signature associated with inducers of the epithelial-to-mesenchymal transition. J Pathol 232:319–29. doi: 10.1002/path.4289
Donaldson NS, Pierre CC, Anstey MI, et al. (2012) Kaiso represses the cell cycle gene cyclin D1 via sequence-specific and methyl-CpG-dependent mechanisms. PLoS One 7:e50398. doi: 10.1371/journal.pone.0050398
Dorudi S, Sheffield JP, Poulsom R, et al. (1993) E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. Am J Pathol 142:981–6.
Dougan M, Dranoff G (2009) Immune therapy for cancer. Annu Rev Immunol 27:83–117. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132544
Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer 3:11–22. doi: 10.1038/nrc969
Drees F, Pokutta S, Yamada S, et al. (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. Cell 123:903–915. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.021
Drewes G, Ebneth A, Preuss U, et al. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. Cell 89:297–308.
Ducarouge B (2011) Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier : Link to inflammation and cancer. 1:
Ducarouge B, Pelissier-Rota M, Lainé M, et al. (2013) CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. PLoS One 8:e79335. doi: 10.1371/journal.pone.0079335
Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, et al. (2007) Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. Mol Cell Biol 27:3804–16. doi: 10.1128/MCB.01590-06
Durbeej M (2010) Laminins. Cell Tissue Res 339:259–68. doi: 10.1007/s00441-009-0838-2
Eads CA, Nickel AE, Laird PW (2002) Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. Cancer Res 62:1296–9.
Early DS, Fontana L, Davidson NO (2008) Translational approaches to addressing complex genetic pathways in colorectal cancer. Transl Res 151:10–6. doi: 10.1016/j.trsl.2007.09.002
Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, et al. (1999) Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2316–21.
Egan JB, Thompson PA, Vitanov M V, et al. (2010) Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate beta-catenin activity in colon cancer cells. Mol Carcinog 49:337–52. doi: 10.1002/mc.20603
Ekblom M, Falk M, Salmivirta K, et al. (1998) Laminin isoforms and epithelial development. Ann N Y Acad Sci 857:194–211.
El Sayegh TY, Arora PD, Fan L, et al. (2005) Phosphorylation of N-cadherin-associated cortactin by Fer kinase regulates N-cadherin mobility and intercellular adhesion strength. Mol Biol Cell 16:5514–27. doi: 10.1091/mbc.E05-05-0410
Elbediwy A, Zihni C, Terry SJ, et al. (2012) Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. J Cell Biol 198:677–93. doi: 10.1083/jcb.201202094
Elzagheid A, Algars A, Bendardaf R, et al. (2006) E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. World J Gastroenterol 12:4304–9.

Espejo R, Rengifo-Cam W, Schaller MD, et al. (2010) PTP-PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. Am J Physiol Cell Physiol 299:C454–63. doi: 10.1152/ajpcell.00148.2010
Etienne-Manneville S (2014) Neighborly relations during collective migration. Curr Opin Cell Biol 30C:51–59. doi: 10.1016/j.ceb.2014.06.004
Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. Nature 420:629–35. doi: 10.1038/nature01148
Fang W Bin, Ireton RC, Zhuang G, et al. (2008) Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism. J Cell Sci 121:358–68. doi: 10.1242/jcs.017145
Fang MZ, Wang Y, Ai N, et al. (2003) Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. Cancer Res 63:7563–70.
Fardini Y, Wang X, Témoin S, et al. (2011) Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. Mol Microbiol 82:1468–1480. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x
Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ (2009) Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 6:297–305. doi: 10.1038/nrgastro.2009.44
Feldman D, Krishnan A V, Swami S, et al. (2014) The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nat Rev Cancer 14:342–57. doi: 10.1038/nrc3691
Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, et al. (2008) A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. J Biol Chem 283:12691–700. doi: 10.1074/jbc.M708887200
Florio P, De Falco G, Leucci E, et al. (2006) Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. J Endocrinol 190:99–105. doi: 10.1677/joe.1.06726
Fodde R (2002) The APC gene in colorectal cancer. Eur J Cancer 38:867–71.
Forster LF, Defres S, Goudie DR, et al. (2000) An investigation of the Peutz-Jeghers gene (LKB1) in sporadic breast and colon cancers. J Clin Pathol 53:791–3.
Franz CM, Ridley AJ (2004) p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. J Biol Chem 279:6588–94. doi: 10.1074/jbc.M312812200
Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. (2007) PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer 97:1139–45. doi: 10.1038/sj.bjc.6604009
Freedman DM, Looker AC, Chang S-C, Graubard BI (2007) Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. J Natl Cancer Inst 99:1594–602. doi: 10.1093/jnci/djm204
Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M, Duluc I (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. Biochem Cell Biol 76:957–69.
Friedl P, Gilmour D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol 10:445–57. doi: 10.1038/nrm2720
Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE (2012) Classifying collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol 14:777–83. doi: 10.1038/ncb2548
Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer 3:362–74. doi: 10.1038/nrc1075
Fries W, Mazzon E, Squarzoni S, et al. (1999) Experimental colitis increases small intestine permeability in the rat. Lab Invest 79:49–57.
Frucht H, Jensen RT, Dexter D, et al. (1999) Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. Clin Cancer Res 5:2532–9.
Fu J, Qin L, He T, et al. (2011) The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. Cell Res 21:275–89. doi: 10.1038/cr.2010.118
Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, et al. (1996) Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. J Biol Chem 271:23022–8.
Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. (2008) Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca2+ absorption between enterocytes. Mol Biol Cell 19:1912–21. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0973
Fujita Y, Krause G, Scheffner M, et al. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. Nat Cell Biol 4:222–31. doi: 10.1038/ncb758
Furlan A, Monzani V, Reznikov LL, et al. Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat). Mol Med 17:353–62. doi: 10.2119/molmed.2011.00020
Gandini S, Boniol M, Haukka J, et al. (2011) Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. Int J Cancer 128:1414–24. doi: 10.1002/ijc.25439
Gardiol D, Zacchi A, Petrera F, et al. (2006) Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. Int J Cancer 119:1285–90. doi: 10.1002/ijc.21982
Gareau MG, Jury J, Perdue MH (2007) Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293:G198–203. doi: 10.1152/ajpgi.00392.2006
GARLAND CF, GARLAND FC (1980) Do Sunlight and Vitamin D Reduce the Likelihood of Colon Cancer? Int J Epidemiol 9:227–231. doi: 10.1093/ije/9.3.227
Gaschott T, Stein J (2003) Short-chain fatty acids and colon cancer cells: the vitamin D receptor--butyrate connection. Recent Results Cancer Res 164:247–57.
Gaschott T, Steinmeyer A, Steinhilber D, Stein J (2002) ZK 156718, a low calcemic, antiproliferative, and prodifferentiating vitamin D analog. Biochem Biophys Res Commun 290:504–9. doi: 10.1006/bbrc.2001.6213
Gassler N, Rohr C, Schneider A, et al. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281:G216–28.
Gates J, Peifer M (2005) Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. Cell 123:769–72. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.009
Gessner R, Tauber R (2000) Intestinal cell adhesion molecules. Liver-intestine cadherin. Ann N Y Acad Sci 915:136–43.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, et al. (2009) Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. Nat Cell Biol 11:1287–96. doi: 10.1038/ncb1973
Giancotti FG (1996) Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. J Cell Sci 109 (Pt 6:1165–72.
Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, et al. (2006) Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches. J Biol Chem 281:11292–300. doi: 10.1074/jbc.M512118200
Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. (2000) Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. Gastroenterology 119:1447–53.
Gilcrease MZ (2007) Integrin signaling in epithelial cells. Cancer Lett 247:1–25. doi: 10.1016/j.canlet.2006.03.031
Giovannucci E (2013) Epidemiology of vitamin D and colorectal cancer. Anticancer Agents Med Chem 13:11–9.
Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ (1991) Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: Effect of cellular differentiation. Arch Biochem Biophys 285:261–269. doi: 10.1016/0003-9861(91)90358-P
Glauben R, Batra A, Fedke I, et al. (2006) Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice. J Immunol 176:5015–22.
Glauben R, Batra A, Stroh T, et al. (2008) Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice. Gut 57:613–22. doi: 10.1136/gut.2007.134650
Gocheva V, Zeng W, Ke D, et al. (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. Genes Dev 20:543–56. doi: 10.1101/gad.1407406
Golas JM, Lucas J, Etienne C, et al. (2005) SKI-606, a Src/Abl inhibitor with in vivo activity in colon tumor xenograft models. Cancer Res 65:5358–64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2484
Golubovskaya VM, Gross S, Kaur AS, et al. (2003) Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. Mol Cancer Res 1:755–64.
Gomez GA, McLachlan RW, Yap AS (2011) Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. Trends Cell Biol 21:499–505. doi: 10.1016/j.tcb.2011.05.006
Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. Nat Rev Immunol 7:52–63. doi: 10.1038/nri1984
González-Sancho JM, Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, et al. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. Anticancer Res 26:2669–81.
Goodwin M, Kovacs EM, Thoreson MA, et al. (2003) Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. J Biol Chem 278:20533–9. doi: 10.1074/jbc.M213171200
Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM (2001) E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. J Cell Biol 153:1049–60.
Goulimari P, Kitzing TM, Knieling H, et al. (2005) Galpha12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dia1 function. J Biol Chem 280:42242–51. doi: 10.1074/jbc.M508690200
Gout P, Jacquier-sarlin MR, Rouard-talbot L, et al. (2001a) grins Is Induced by Laminin-5 during Early Stage of HT-29 Cell Differentiation. 12:3268–3281.
Gout S, Marie C, Lainé M, et al. (2004) Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. Exp Cell Res 299:498–510. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.06.008
Gout SP, Jacquier-Sarlin MR, Rouard-Talbot L, et al. (2001b) RhoA-dependent switch between alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins is induced by laminin-5 during early stage of HT-29 cell differentiation. Mol Biol Cell 12:3268–81.
Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, et al. (1995) E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Res 55:5195–9.
Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, et al. (2003) Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. J Cell Biol 161:793–804. doi: 10.1083/jcb.200209019
Griffiths GJ, Koh MY, Brunton VG, et al. (2004) Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis. J Biol Chem 279:46113–21. doi: 10.1074/jbc.M408550200
Grimoud J, Durand H, de Souza S, et al. (2010) In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Int J Food Microbiol 144:42–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.007
Grinnell KL, Casserly B, Harrington EO (2010) Role of protein tyrosine phosphatase SHP2 in barrier function of pulmonary endothelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 298:L361–70. doi: 10.1152/ajplung.00374.2009
Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001) p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. J Cell Sci 114:695–707.
Gross KJ, Pothoulakis C (2007) Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 13:918–32. doi: 10.1002/ibd.20129
Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J Cell Biol 107:1575–87.
Gumbiner BM (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol 148:399–404.
Guslandi M (2005) Antibiotics for inflammatory bowel disease: do they work? Eur J Gastroenterol Hepatol 17:145–7.
Haas P, Gilmour D (2006) Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. Dev Cell 10:673–80. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.019
Hajra KM, Chen DY-S, Fearon ER (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res 62:1613–8.
Halline AG, Davidson NO, Skarosi SF, et al. (1994) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on proliferation and differentiation of Caco-2 cells. Endocrinology 134:1710–7. doi: 10.1210/endo.134.4.8137734
Han YW, Ikegami A, Rajanna C, et al. (2005) Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. J Bacteriol 187:5330–5340. doi: 10.1128/JB.187.15.5330-5340.2005

Hanna J, Saha K, Pando B, et al. (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature 462:595–601. doi: 10.1038/nature08592
Hanna JH, Saha K, Jaenisch R (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. Cell 143:508–25. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.008
Hao Y, Du Q, Chen X, et al. (2010) Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. Curr Biol 20:1809–18. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.032
Harrison OJ, Corps EM, Kilshaw PJ (2005) Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. J Cell Sci 118:4123–30. doi: 10.1242/jcs.02539
Harrison OJ, Jin X, Hong S, et al. (2011) The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. Structure 19:244–56. doi: 10.1016/j.str.2010.11.016
Hartnett L, Egan LJ (2012) Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. Carcinogenesis 33:723–731. doi: 10.1093/carcin/bgs006
Hartsock A, Nelson WJ (2012) Competitive regulation of E-cadherin juxtamembrane domain degradation by p120-catenin binding and Hakai-mediated ubiquitination. PLoS One 7:e37476. doi: 10.1371/journal.pone.0037476
Hatzfeld M (1999) The armadillo family of structural proteins. Int Rev Cytol 186:179–224.
Häussinger D, Ahrens T, Sass H-J, et al. (2002) Calcium-dependent Homoassociation of E-cadherin by NMR Spectroscopy: Changes in Mobility, Conformation and Mapping of Contact Regions. J Mol Biol 324:823–839. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01137-3
Hayashido Y, Hamana T, Yoshioka Y, et al. (2005) Plasminogen activator/plasmin system suppresses cell-cell adhesion of oral squamous cell carcinoma cells via proteolysis of E-cadherin. Int J Oncol 27:693–8.
Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, et al. (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. J Cell Biol 148:779–90.
He TC, Sparks AB, Rago C, et al. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281:1509–12.
He XC, Yin T, Grindley JC, et al. (2007) PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. Nat Genet 39:189–98. doi: 10.1038/ng1928
Hegazi RAF, Mady HH, Melhem MF, et al. (2003) Celecoxib and rofecoxib potentiate chronic colitis and premalignant changes in interleukin 10 knockout mice. Inflamm Bowel Dis 9:230–6.
Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker E-B, Friedl P (2002) Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. Cancer Res 62:2125–30.
Hellberg CB, Burden-Gulley SM, Pietz GE, Brady-Kalnay SM (2002) Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. J Biol Chem 277:11165–73. doi: 10.1074/jbc.M112157200
Hemavathy K, Guru SC, Harris J, et al. (2000) Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. Mol Cell Biol 20:5087–95.
Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. Nature 391:184–7. doi: 10.1038/34432
Hendrich B, Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. Trends Genet 19:269–77. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00080-5
Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H (1979) Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. Eur J Immunol 9:657–9. doi: 10.1002/eji.1830090817
Hermiston ML, Gordon JI (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. Science 270:1203–7.
Herranz N, Pasini D, Díaz VM, et al. (2008) Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. Mol Cell Biol 28:4772–81. doi: 10.1128/MCB.00323-08
Hintermann E, Yang N, O'Sullivan D, et al. (2005) Integrin alpha6beta4-erbB2 complex inhibits haptotaxis by up-regulating E-cadherin cell-cell junctions in keratinocytes. J Biol Chem 280:8004–15. doi: 10.1074/jbc.M406301200
Hiramoto-Yamaki N, Takeuchi S, Ueda S, et al. (2010) Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. J Cell Biol 190:461–77. doi: 10.1083/jcb.201005141
Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, et al. (1992) Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. Cell 70:293–301.
Hirsch D, Barker N, McNeil N, et al. (2014) LGR5 positivity defines stem-like cells in colorectal cancer. Carcinogenesis 35:849–58. doi: 10.1093/carcin/bgt377
Hisamatsu T, Inoue N, Yajima T, et al. (2007) Psychological aspects of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 42 Suppl 1:34–40. doi: 10.1007/s00535-006-1937-4
Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, et al. (2004) SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. Mol Cancer Ther 3:737–45.
Hong JY, Park J-I, Cho K, et al. (2010a) Shared molecular mechanisms regulate multiple catenin proteins: canonical Wnt signals and components modulate p120-catenin isoform-1 and additional p120 subfamily members. J Cell Sci 123:4351–65. doi: 10.1242/jcs.067199
Hong S, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM (2010b) Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 107:3528–33. doi: 10.1073/pnas.0911027107
Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, et al. (2009) Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. J Cell Sci 122:1595–606. doi: 10.1242/jcs.043174
Hoshino T, Sakisaka T, Baba T, et al. (2005) Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. J Biol Chem 280:24095–103. doi: 10.1074/jbc.M414447200
Hosking CR, Ulloa F, Hogan C, et al. (2007) The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. Mol Biol Cell 18:1918–27. doi: 10.1091/mbc.E06-10-0941

Hou F, Yuan W, Huang J, et al. (2012) Overexpression of EphA2 correlates with epithelial-mesenchymal transition-related proteins in gastric cancer and their prognostic importance for postoperative patients. Med Oncol 29:2691–700. doi: 10.1007/s12032-011-0127-2
Houde M, Laprise P, Jean D, et al. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. J Biol Chem 276:21885–94. doi: 10.1074/jbc.M100236200
Huang J, Xiao D, Li G, et al. (2014) EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/β-catenin pathway in gastric cancer cells. Oncogene 33:2737–47. doi: 10.1038/onc.2013.238
Huang Z-H, Li L-H, Yang F, Wang J-F (2007) Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. World J Gastroenterol 13:950–4.
Hubbard SR, Till JH (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem 69:373–98. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373
Huber AH, Weis WI, West CD (2001) The Structure of the -Catenin / E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by -Catenin. 105:391–402.
Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol 213:374–83. doi: 10.1002/jcp.21223
Hulpiau P, van Roy F (2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. Int J Biochem Cell Biol 41:349–69. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.027
Hurd TW, Fan S, Liu CJ, et al. (2003) Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. Curr Biol 13:2082–90.
Hurov JB, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. Curr Biol 14:736–41. doi: 10.1016/j.cub.2004.04.007
Ichii S, Horii A, Nakatsuru S, et al. (1992) Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). Hum Mol Genet 1:387–390. doi: 10.1093/hmg/1.6.387
Ichii T, Takeichi M (2007) p120-catenin regulates microtubule dynamics and cell migration in a cadherin-independent manner. Genes Cells 12:827–39. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01095.x
Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, et al. (1999) Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. J Cell Biol 146:1117–32.
Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N (2001) Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. J Surg Oncol 77:201–7.
Ilina O, Friedl P (2009) Mechanisms of collective cell migration at a glance. J Cell Sci 122:3203–8. doi: 10.1242/jcs.036525
Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, et al. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. Mol Pharmacol 62:65–74.
Irby RB, Mao W, Coppola D, et al. (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. Nat Genet 21:187–90. doi: 10.1038/5971
Irby RB, Yeatman TJ (2000) Role of Src expression and activation in human cancer. Oncogene 19:5636–42. doi: 10.1038/sj.onc.1203912
Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, et al. (2004) Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. Semin Cell Dev Biol 15:643–56. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.09.002
Ishiyama N, Lee S-H, Liu S, et al. (2010) Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. Cell 141:117–128. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.017
Issenman RM, Jenkins RT, Radoja C (1993) Intestinal permeability compared in pediatric and adult patients with inflammatory bowel disease. Clin Invest Med 16:187–96.
Ivanov AI, Hunt D, Utech M, et al. (2005) Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. Mol Biol Cell 16:2636–50. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0043
Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, et al. (1998) Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. Cancer Res 58:1021–6.
Izumi G, Sakisaka T, Baba T, et al. (2004) Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. J Cell Biol 166:237–48. doi: 10.1083/jcb.200401078
Jaenisch R, Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132:567–82. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015
Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, et al. (2005) E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. Cancer Res 65:483–92.
Jahn HU, Ullrich R, Schneider T, et al. (1996) Immunological and trophical effects of Saccharomyces boulardii on the small intestine in healthy human volunteers. Digestion 57:95–104.
Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, et al. (1998) Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn″s colitis. Lab Invest 78:1155–67.
Jankowski JA, Bedford FK, Kim YS (1997) Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 57:187–215.
Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, et al. (2010) Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations:a nested case-control study. BMJ 340:b5500. doi: 10.1136/bmj.b5500
Jenkins RT, Ramage JK, Jones DB, et al. (1988) Small bowel and colonic permeability to 51Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. Clin Invest Med 11:151–5.
Jia J, Starodub A, Cushman I, et al. (2013) Dual inhibition of αV integrins and Src kinase activity as a combination therapy strategy for colorectal cancer. Anticancer Drugs 24:237–250. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835d29fd
Jiang G, Wang Y, Dai S, et al. (2012) P120-catenin isoforms 1 and 3 regulate proliferation and cell cycle of lung cancer cells via β-catenin and Kaiso respectively. PLoS One 7:e30303. doi: 10.1371/journal.pone.0030303
Jiang H, Wu D, Simon MI (1993) The transforming activity of activated G alpha 12. FEBS Lett 330:319–22.

Jin L, Zhang Q, Guo R, et al. (2011) Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. J Mol Endocrinol 47:219–27. doi: 10.1530/JME-11-0048
Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS (2007) Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. Cancer 109:1811–20. doi: 10.1002/cncr.22606
Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 19:187–91. doi: 10.1038/561
Jones RG, Li X, Gray PD, et al. (2006) Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. J Cell Biol 175:505–14. doi: 10.1083/jcb.200602160
Joo C-K, Kim H-S, Park J-Y, et al. (2008) Ligand release-independent transactivation of epidermal growth factor receptor by transforming growth factor-beta involves multiple signaling pathways. Oncogene 27:614–28. doi: 10.1038/sj.onc.1210649
Jüttermann R, Li E, Jaenisch R (1994) Toxicity of 5-aza-2′-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A 91:11797–801.
Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L (2009) The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. Cancer Microenviron. doi: 10.1007/s12307-009-0030-y
Kang W, Lee S, Jeon E, et al. (2011) Emerging role of vitamin D in colorectal cancer. World J Gastrointest Oncol 3:123–7. doi: 10.4251/wjgo.v3.i8.123
Kaplan DD, Meigs TE, Casey PJ (2001) Distinct regions of the cadherin cytoplasmic domain are essential for functional interaction with Galpha 12 and beta-catenin. J Biol Chem 276:44037–43. doi: 10.1074/jbc.M106121200
Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Chemonidou MC, et al. (2010a) Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. Neuropeptides 44:355–61. doi: 10.1016/j.npep.2010.06.005
Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Kortsaris A, Chatzaki E (2010b) The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. Cell Mol Life Sci 67:1293–306. doi: 10.1007/s00018-010-0265-2
Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al. Expression patterns of the E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex in gastric cancer. Hepatogastroenterology 47:1465–9.
Kedinger M, Lefebvre O, Duluc I, et al. (1998) Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 353:847–56. doi: 10.1098/rstb.1998.0249
Keilhack H, Hellman U, van Hengel J, et al. (2000) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. J Biol Chem 275:26376–84. doi: 10.1074/jbc.M001315200
Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, et al. (1998) Molecular Cloning of the Human p120 ctn Catenin Gene (CTNND1): Expression of Multiple Alternatively Spliced Isoforms. Genomics 146:129–146.
Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM (2004) NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. J Cell Sci 117:2675–86. doi: 10.1242/jcs.01101
Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos. Cell 52:311–320. doi: S0092-8674(88)80024-2 [pii]
Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, et al. (1998) Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. Am J Physiol 275:G1037–44.
Kim JB, Islam S, Kim YJ, et al. (2000a) N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. J Cell Biol 151:1193–206.
Kim NH, Kim HS, Li X-Y, et al. (2011a) A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol 195:417–33. doi: 10.1083/jcb.201103097
Kim SH, Li Z, Sacks DB (2000b) E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. J Biol Chem 275:36999–7005. doi: 10.1074/jbc.M003430200
Kim SW, Park J-I, Spring CM, et al. (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. Nat Cell Biol 6:1212–20. doi: 10.1038/ncb1191
Kim T, Veronese A, Pichiorri F, et al. (2011b) p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. J Exp Med 208:875–83. doi: 10.1084/jem.20110235
Kim Y, Kugler MC, Wei Y, et al. (2009) Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. J Cell Biol 184:309–22. doi: 10.1083/jcb.200806067
Kobielak A, Pasolli HA, Fuchs E (2004) Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. Nat Cell Biol 6:21–30. doi: 10.1038/ncb1075
Koch S, Nusrat A (2012) The life and death of epithelia during inflammation: lessons learned from the gut. Annu Rev Pathol 7:35–60. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-120905
Koizume S, Tachibana K, Sekiya T, et al. (2002) Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. Nucleic Acids Res 30:4770–80.
Kolega J (1981) The movement of cell clusters in vitro: morphology and directionality. J Cell Sci 49:15–32.
Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K (1998) Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. Cancer Res 58:2014–9.
Kong W, Yang H, He L, et al. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. Mol Cell Biol 28:6773–84. doi: 10.1128/MCB.00941-08
Kooistra MRH, Dubé N, Bos JL (2007) Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. J Cell Sci 120:17–22. doi: 10.1242/jcs.03306
Koopmansch B, Berx G, Foidart J-M, et al. (2013) Interplay between KLF4 and ZEB2/SIP1 in the regulation of E-cadherin expression. Biochem Biophys Res Commun 431:652–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.070
Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, et al. (2009) Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. Cancer Res 69:3842–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2246
Kopp R, Lambrecht G, Mutschler E, et al. (1989) Human HT-29 colon carcinoma cells contain muscarinic M3 receptors coupled to phosphoinositide metabolism. Eur J Pharmacol Mol Pharmacol 172:397–405. doi: 10.1016/0922-4106(89)90021-7

Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ (2013) p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. Prog Mol Biol Transl Sci 116:409–32. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2
Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ, Yap AS (2002) E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. J Biol Chem 277:6708–18. doi: 10.1074/jbc.M109640200
Kovacs EM, Verma S, Ali RG, et al. (2011) N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. Nat Cell Biol 13:934–43. doi: 10.1038/ncb2290
Krakstad BF, Ardawatia V V, Aragay AM (2004) A role for Galpha12/Galpha13 in p120ctn regulation. Proc Natl Acad Sci U S A 101:10314–9. doi: 10.1073/pnas.0401366101
Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, et al. (2013) High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer. BMC Res Notes 6:253. doi: 10.1186/1756-0500-6-253
Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, et al. (2007) Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. J Clin Oncol 25:2198–204. doi: 10.1200/JCO.2006.08.2974
Kumar SR, Scehnet JS, Ley EJ, et al. (2009) Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression. Cancer Res 69:3736–45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3232
Kurkjian C, Kummar S Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. Am J Ther 16:412–20. doi: 10.1097/MJT.0b013e3181907ed9
Kurkjian C, Kummar S, Murgo AJ DNA methylation: its role in cancer development and therapy. Curr Probl Cancer 32:187–235. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2008.08.002
Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, et al. (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. Cell 81:197–205. doi: 10.1016/0092-8674(95)90329-1
Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, et al. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. Mol Pharmacol 62:58–64.
Laprise P, Chailler P, Houde M, et al. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. J Biol Chem 277:8226–34. doi: 10.1074/jbc.M110235200
Larauche M, Kiank C, Tache Y (2009) Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. J Physiol Pharmacol 60 Suppl 7:33–46.
Larriba MJ, Martín-Villar E, García JM, et al. (2009) Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. Carcinogenesis 30:1459–68. doi: 10.1093/carcin/bgp140
Larriba MJ, Valle N, Pálmer HG, et al. (2007) The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. Endocr Relat Cancer 14:141–51. doi: 10.1677/ERC-06-0028
Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8263–7.
Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. Cell Adh Migr 6:365–373. doi: 10.4161/cam.21326
Le Duc Q, Shi Q, Blonk I, et al. (2010) Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. J Cell Biol 189:1107–15. doi: 10.1083/jcb.201001149
LEBLOND CP, STEVENS CE (1948) The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. Anat Rec 100:357–77.
Lecaudey V, Gilmour D (2006) Organizing moving groups during morphogenesis. Curr Opin Cell Biol 18:102–7. doi: 10.1016/j.ceb.2005.12.001
Lee G, Goretsky T, Managlia E, et al. (2010) Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. Gastroenterology 139:869–81, 881.e1–9. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.037
Lee H, Flaherty P, Ji HP (2013) Systematic genomic identification of colorectal cancer genes delineating advanced from early clinical stage and metastasis. BMC Med Genomics 6:54. doi: 10.1186/1755-8794-6-54
Lee KH, Choi EY, Hyun MS, et al. (2007) Association of extracellular cleavage of E-cadherin mediated by MMP-7 with HGF-induced in vitro invasion in human stomach cancer cells. Eur Surg Res 39:208–15. doi: 10.1159/000101452
Lee S, Bang S, Song K, Lee I (2006) Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. Oncol Rep 16:747–54.
Lee SK, Kim YW, Chi S-G, et al. (2009) The effect of Saccharomyces boulardii on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Dig Dis Sci 54:255–63. doi: 10.1007/s10620-008-0357-0
Leivo I, Tani T, Laitinen L, et al. (1996) Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. J Histochem Cytochem 44:1267–77.
Leu T-H, Su SL, Chuang Y-C, Maa M-C (2003) Direct inhibitory effect of curcumin on Src and focal adhesion kinase activity. Biochem Pharmacol 66:2323–31.
Li D, Zhou J, Wang L, et al. (2010) Integrated biochemical and mechanical signals regulate multifaceted human embryonic stem cell functions. J Cell Biol 191:631–44. doi: 10.1083/jcb.201006094
Li R-X, Chen Z-H, Chen Z-K (2014) The role of EPH receptors in cancer-related epithelial-mesenchymal transition. Chin J Cancer 33:231–40. doi: 10.5732/cjc.013.10108
Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res 66:3992–5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191
Lightman SL (2008) The neuroendocrinology of stress: a never ending story. J Neuroendocrinol 20:880–4. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01711.x
Lilien J, Balsamo J, Arregui C, Xu G (2002) Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. Dev Dyn 224:18–29. doi: 10.1002/dvdy.10087
Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, et al. (2000) A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. Nat Cell Biol 2:540–7. doi: 10.1038/35019582

Lin G-P, Li X-Y, Huang J-W, et al. (2007) [Inhibitory effects of tumor suppressor gene PTEN on proliferation and metastasis of breast cancer ZR-75-1 cells]. Ai Zheng 26:1069–1073.
Linhart HG, Lin H, Yamada Y, et al. (2007) Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. Genes Dev 21:3110–22. doi: 10.1101/gad.1594007
Liu LX, Lee NP, Chan VW, et al. (2009) Targeting cadherin-17 inactivates Wnt signaling and inhibits tumor growth in liver carcinoma. Hepatology 50:1453–63. doi: 10.1002/hep.23143
Liu X, Wang C, Chen Z, et al. (2011) MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. Biochem J 440:23–31. doi: 10.1042/BJ20111006
Lochter A, Galosy S, Muschler J, et al. (1997) Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J Cell Biol 139:1861–72.
Lohi J, Leivo I, Tani T, et al. (1996) Laminins, tenascin and type VII collagen in colorectal mucosa. Histochem J 28:431–40.
Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, et al. (2006) E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. Br J Cancer 94:661–71. doi: 10.1038/sj.bjc.6602996
Lu J, Getz G, Miska EA, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435:834–8. doi: 10.1038/nature03702
Lu T-Y, Lu R-M, Liao M-Y, et al. (2010) Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. J Biol Chem 285:8719–32. doi: 10.1074/jbc.M109.077081
Lu W, Mayer BJ (1999) Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization. Oncogene 18:797–806. doi: 10.1038/sj.onc.1202361
Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T (2003) Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. Cancer Cell 4:499–515.
Ma L, Young J, Prabhala H, et al. (2010) miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. Nat Cell Biol 12:247–56. doi: 10.1038/ncb2024
Maaser K, Borlak J (2008) A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. Br J Cancer 99:1635–43. doi: 10.1038/sj.bjc.6604725
Machado JC, Soares P, Carneiro F, et al. (1999) E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. Lab Invest 79:459–65.
Maddugoda MP, Crampton MS, Shewan AM, Yap AS (2007) Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. J Cell Biol 178:529–40. doi: 10.1083/jcb.200612042
Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. Nat Cell Biol 11:162–71. doi: 10.1038/ncb1824
Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 133:704–15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
Marambaud P, Shioi J, Serban G, et al. (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. EMBO J 21:1948–56. doi: 10.1093/emboj/21.8.1948
Marambaud P, Wen PH, Dutt A, et al. (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. Cell 114:635–45.
Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, et al. (2005) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 102:9182–7. doi: 10.1073/pnas.0500918102
Mariadason JM, Barkla DH, Gibson PR (1997) Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. Am J Physiol 272:G705–12.
Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, et al. (2001) Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. Cancer Res 61:3465–71.
Marin ML, Geller SA, Greenstein AJ, et al. (1983) Ultrastructural pathology of Crohn″s disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies. Am J Gastroenterol 78:355–64.
Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, et al. (2001) Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. J Biol Chem 276:28006–13. doi: 10.1074/jbc.M102443200
Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Rüegg C (2007) N-cadherin as a therapeutic target in cancer. Expert Opin Investig Drugs 16:451–65. doi: 10.1517/13543784.16.4.451
Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med 361:2449–60. doi: 10.1056/NEJMra0804588
Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, et al. (2012) Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. Cell Stem Cell 11:491–504. doi: 10.1016/j.stem.2012.06.008
Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M (2012) Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. Nat Rev Cancer 12:23–38. doi: 10.1038/nrc3169
Martinez-Rico C, Pincet F, Thiery J-P, Dufour S (2010) Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. J Cell Sci 123:712–22. doi: 10.1242/jcs.047878
Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. Nature 461:1282–6. doi: 10.1038/nature08530
Mastroianni JR, Ouellette AJ (2009) Alpha-defensins in enteric innate immunity: functional Paneth cell alpha-defensins in mouse colonic lumen. J Biol Chem 284:27848–56. doi: 10.1074/jbc.M109.050773
Masuda T, Saito H, Kaneko F, et al. (2000) Up-regulation of E-cadherin and I-catenin in human hepatocellular carcinoma cell lines by sodium butyrate and interferon-alpha. In Vitro Cell Dev Biol Anim 36:387–94.
Matsuyama S, Iwadate M, Kondo M, et al. (2003) SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. Cancer Res 63:7791–8.
Maunder RG, Levenstein S (2008) The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. Curr Mol Med 8:247–52.

Mawdsley JE, Rampton DS (2006) The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. Neuroimmunomodulation 13:327–36. doi: 10.1159/000104861
May R, Riehl TE, Hunt C, et al. (2008) Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. Stem Cells 26:630–7. doi: 10.1634/stemcells.2007-0621
McCormick DA, Horton LW, Mee AS (1990) Mucin depletion in inflammatory bowel disease. J Clin Pathol 43:143–6.
McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991) A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. Science 254:1359–1361.
McLachlan RW, Kraemer A, Helwani FM, et al. (2007) E-cadherin adhesion activates c-Src signaling at cell-cell contacts. Mol Biol Cell 18:3214–3223. doi: 10.1091/mbc.E06-12-1154
Meigs TE, Fedor-Chaiken M, Kaplan DD, et al. (2002) Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. J Biol Chem 277:24594–600. doi: 10.1074/jbc.M201984200
Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ (2001) Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. Proc Natl Acad Sci U S A 98:519–24. doi: 10.1073/pnas.021350998
Mercurio AM (1995) Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. Trends Cell Biol 5:419–23.
Miao H, Li D-Q, Mukherjee A, et al. (2009) EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. Cancer Cell 16:9–20. doi: 10.1016/j.ccr.2009.04.009
Miceli F, Ranelletti FO, Martinelli E, et al. (2009) Expression and subcellular localization of CRH and its receptors in human endometrial cancer. Mol Cell Endocrinol 305:6–11. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.013
Michael M, Yap AS (2013) The regulation and functional impact of actin assembly at cadherin cell-cell adhesions. Semin Cell Dev Biol 24:298–307. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.12.004
Miki K, Moore DJ, Butler RN, et al. (1998) The sugar permeability test reflects disease activity in children and adolescents with inflammatory bowel disease. J Pediatr 133:750–4.
Miller G, Chen E, Cole SW (2009) Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. Annu Rev Psychol 60:501–24. doi: 10.1146/annurev.psych.60.110707.163551
Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, et al. (1999) Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. Cancer Res 59:3346–51.
Miranda KC, Khromykh T, Christy P, et al. (2001) A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. J Biol Chem 276:22565–72. doi: 10.1074/jbc.M101907200
Miura K, Nam J-M, Kojima C, et al. (2009) EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. Mol Biol Cell 20:1949–59. doi: 10.1091/mbc.E08-06-0549
Miyashita Y, Ozawa M (2007) A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. J Cell Sci 120:4395–406. doi: 10.1242/jcs.03489
Mo YY, Reynolds AB (1996) Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. Cancer Res 56:2633–40.
Modica S, Gofflot F, Murzilli S, et al. (2010) The intestinal nuclear receptor signature with epithelial localization patterns and expression modulation in tumors. Gastroenterology 138:636–48, 648.e1–12. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.060
Monea S, Jordan BA, Srivastava S, et al. (2006) Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. J Neurosci 26:2300–12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3521-05.2006
Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 275:1787–90.
Moroni M, Sartore-Bianchi A, Veronese S, Siena S (2008) EGFR FISH in colorectal cancer: what is the current reality? Lancet Oncol 9:402–3. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70109-8
Morson BC (1972) Rectal biopsy in inflammatory bowel disease. N Engl J Med 287:1337–9. doi: 10.1056/NEJM197212282872607
Moser A, Pitot H, Dove W (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. Science (80-) 247:322–324. doi: 10.1126/science.2296722
Mourton T, Hellberg CB, Burden-Gulley SM, et al. (2001) The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts. J Biol Chem 276:14896–14901. doi: 10.1074/jbc.M010823200
Munkholm P, Langholz E, Hollander D, et al. (1994) Intestinal permeability in patients with Crohn"s disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. Gut 35:68–72.
Munz M, Baeuerle P a, Gires O (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. Cancer Res 69:5627–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0654
Münz M, Kieu C, Mack B, et al. (2004) The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. Oncogene 23:5748–58. doi: 10.1038/sj.onc.1207610
Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, et al. (2002) Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. J Clin Invest 109:1551–9. doi: 10.1172/JCI15234
Murchie R, Guo C-H, Persaud A, et al. (2014) Protein tyrosine phosphatase ζ targets apical junction complex proteins in the intestine and regulates epithelial permeability. Proc Natl Acad Sci U S A 111:693–8. doi: 10.1073/pnas.1315017111
Murgia C, Blaikie P, Kim N, et al. (1998) Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. EMBO J 17:3940–51. doi: 10.1093/emboj/17.14.3940
Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. EMBO J 7:3679–84.
Najy AJ, Day KC, Day ML (2008) The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. J Biol Chem 283:18393–401. doi: 10.1074/jbc.M801329200
Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, et al. (2001) Age-related hypermethylation of the 5" region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. Cancer Res 61:6991–5.

Nakagawa S, Takeichi M (1998) Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. Development 125:2963–71.
Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, et al. (2013) Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet 45:98–103. doi: 10.1038/ng.2481
Nakayama H, Hibi K, Takase T, et al. (2003) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients. Int J Cancer 105:491–3. doi: 10.1002/ijc.11117
Nam J-S, Ino Y, Kanai Y, et al. (2004) 5-aza-2″-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. Clin Exp Metastasis 21:49–56.
Nanes BA, Chiasson-MacKenzie C, Lowery AM, et al. (2012) p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. J Cell Biol 199:365–80. doi: 10.1083/jcb.201205029
Natalwala A, Spychal R, Tselepis C (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. World J Gastroenterol 14:3792–7.
Nava P, Koch S, Laukoetter MG, et al. (2010) Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. Immunity 32:392–402. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.001
Navarro C, Nola S, Audebert S, et al. (2005) Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. Oncogene 24:4330–9. doi: 10.1038/sj.onc.1208632
Nawroth R, Poell G, Ranft A, et al. (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. EMBO J 21:4885–95.
Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science 303:1483–7. doi: 10.1126/science.1094291
Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, et al. (2003) Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285:G1028–36. doi: 10.1152/ajpgi.00066.2003
Nguyen TT-B, Ward JPT, Hirst SJ (2005) beta1-Integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. Am J Respir Crit Care Med 171:217–23. doi: 10.1164/rccm.200408-1046OC
Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol 127:2525–32. doi: 10.1038/sj.jid.5700865
Nieto MA (2011) The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease.
Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, et al. (2000) Interaction between Wnt and TGF- ␣ signalling pathways during formation of Spemann ″ s organizer. 357:781–785.
Nita-Lazar M, Rebustini I, Walker J, Kukuruzinska MA (2010) Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. Exp Cell Res 316:1871–1884. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.008
Noë V, Fingleton B, Jacobs K, et al. (2001) Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci 114:111–118.
Nolan ME, Aranda V, Lee S, et al. (2008) The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. Cancer Res 68:8201–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6567
Nollet F, Kools P, van Roy F (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J Mol Biol 299:551–72. doi: 10.1006/jmbi.2000.3777
Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. J Cell Biol 150:567–80.
O′Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 445:106–10. doi: 10.1038/nature05372
O′Malley KE, Farrell CB, O′Boyle KM, Baird AW (1995) Cholinergic activation of Cl- secretion in rat colonic epithelia. Eur J Pharmacol 275:83–9.
Ogasawara N, Tsukamoto T, Mizoshita T, et al. (2006) Mutations and nuclear accumulation of beta-catenin correlate with intestinal phenotypic expression in human gastric cancer. Histopathology 49:612–21. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02560.x
Ohno H, Uemura K, Shintani-Ishida K, et al. (2007) Ischemia promotes calpain-mediated degradation of p120-catenin in SH-SY5Y cells. Biochem Biophys Res Commun 353:547–52. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.061
Ohsugi M, Butz S, Kemler R (1999) Beta-catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development. Dev Dyn 216:168–76. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199910)216:2<168::AID-DVDY7>3.0.CO;2-R
Ooshio T, Fujita N, Yamada A, et al. (2007) Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. J Cell Sci 120:2352–65. doi: 10.1242/jcs.03470
Ordóñez-Morán P, Alvarez-Díaz S, Valle N, et al. (2010) The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on colon cancer cells depend on RhoA-ROCK-p38MAPK-MSK signaling. J Steroid Biochem Mol Biol 121:355–61. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.031
Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Pálmer HG, et al. (2008) RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. J Cell Biol 183:697–710. doi: 10.1083/jcb.200803020
Ordonez-Moran P, Larriba MJ, Pendas-Franco N, et al. (2005) Vitamin D and cancer: an update of in vitro and in vivo data. Front Biosci 10:2723–49.
Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. Cell 121:335–48. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034
Orsulic S, Huber O, Aberle H, et al. (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. J Cell Sci 112 (Pt 8:1237–45.
Orsulic S, Kemler R (2000) Expression of Eph receptors and ephrins is differentially regulated by E-cadherin. J Cell Sci 113 (Pt 1:1793–802.
Overduin M, Harvey TS, Bagby S, et al. (1995) Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. Science 267:386–9.

Ozawa M, Kemler R (1998) Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. J Biol Chem 273:6166–6170.
Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C (2005) Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. Mol Cell Biol 25:389–402. doi: 10.1128/MCB.25.1.389-402.2005
Palmer HG (2001) Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. J Cell Biol 154:369–388. doi: 10.1083/jcb.200102028
Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, et al. (2004) The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. Nat Med 10:917–9. doi: 10.1038/nm1095
Pálmer HG, Sánchez-Carbayo M, Ordóñez-Morán P, et al. (2003) Genetic signatures of differentiation induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. Cancer Res 63:7799–806.
Pan Y-Z, Gao W, Yu A-M (2009) MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. Drug Metab Dispos 37:2112–7. doi: 10.1124/dmd.109.027680
Pang J-H, Kraemer A, Stehbens SJ, et al. (2005) Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. J Biol Chem 280:3043–50. doi: 10.1074/jbc.M412148200
Papkoff J (1997) Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. J Biol Chem 272:4536–4543.
Parisini E, Higgins JMG, Liu J, et al. (2007) The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. J Mol Biol 373:401–411. doi: 10.1016/j.jmb.2007.08.011
Park J, Ji H, Jun S, et al. (2006) Frodo links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. Dev Cell 11:683–95. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.022
Park J-I, Kim SW, Lyons JP, et al. (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. Dev Cell 8:843–54. doi: 10.1016/j.devcel.2005.04.010
Paterson AD, Parton RG, Ferguson C, et al. (2003) Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. J Biol Chem 278:21050–21057. doi: 10.1074/jbc.M300082200
Pece S, Gutkind JS (2002) E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? Nat Cell Biol 4:E72–4. doi: 10.1038/ncb0402-e72
Peglion F, Llense F, Etienne-Manneville S (2014) Adherens junction treadmilling during collective migration. Nat Cell Biol 16:639–51. doi: 10.1038/ncb2985
Peignon G, Thenet S, Schreider C, et al. (2006) E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. J Biol Chem 281:3560–8. doi: 10.1074/jbc.M506360200
Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer 7:415–28. doi: 10.1038/nrc2131
Pelissier-rota M, Lainé M, Ducarouge B, et al. (2013) Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer : Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation ? 2013:1116–1131.
Peña C, García JM, García V, et al. (2006) The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. Int J Cancer 119:2098–104. doi: 10.1002/ijc.22083
Peña C, García JM, Larriba MJ, et al. (2009) SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. Oncogene 28:4375–85. doi: 10.1038/onc.2009.285
Peng L, Li Z-R, Green RS, et al. (2009) Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. J Nutr 139:1619–25. doi: 10.3945/jn.109.104638
Perchiniak EM, Groden J (2011) Mechanisms Regulating Microtubule Binding, DNA Replication, and Apoptosis are Controlled by the Intestinal Tumor Suppressor APC. Curr Colorectal Cancer Rep 7:145–151. doi: 10.1007/s11888-011-0088-z
Pereira F, Larriba MJ, Muñoz A (2012) Vitamin D and colon cancer. Endocr Relat Cancer 19:R51–71. doi: 10.1530/ERC-11-0388
Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 392:190–3. doi: 10.1038/32433
Pieters T, van Hengel J, van Roy F (2012) Functions of p120ctn in development and disease. Front Biosci (Landmark Ed 17:760–83.
Pieters T, van Roy F (2014) Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. J Cell Sci 127:2603–13. doi: 10.1242/jcs.146720
Platta HW, Stenmark H (2011) Endocytosis and signaling. Curr Opin Cell Biol 23:393–403. doi: 10.1016/j.ceb.2011.03.008
Platz EA, Hankinson SE, Hollis BW, et al. (2000) Plasma 1,25-dihydroxy- and 25-hydroxyvitamin D and adenomatous polyps of the distal colorectum. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:1059–65.
Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J (1994) Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. Eur J Biochem 223:1019–26.
Pories S, Jaros K, Steele G, et al. (1992) Oncogene-mediated transformation of fetal rat colon in vitro. Oncogene 7:885–93.
Pothoulakis C (2009) Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol Ther 30:826–833. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04102.x
Pothoulakis C, Castagliuolo I, Leeman SE (1998) Neuroimmune mechanisms of intestinal responses to stress. Role of corticotropin-releasing factor and neurotensin. Ann N Y Acad Sci 840:635–48.
Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 359:235–7. doi: 10.1038/359235a0
Prall F (2007) Tumour budding in colorectal carcinoma. Histopathology 50:151–62. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02551.x
Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, et al. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. Genes Dev 15:1613–8. doi: 10.1101/gad.198501
Pulido R, Serra-Pagès C, Tang M, Streuli M (1995) The LAR/PTP delta/PTP sigma subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP delta, and PTP sigma isoforms are expressed in a tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1. Proc Natl Acad Sci U S A 92:11686–11690.

Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG (2005) The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. J Cell Biol 171:1061–71. doi: 10.1083/jcb.200506094
Radford-Smith G, Jewell DP (1996) Cytokines and inflammatory bowel disease. Baillieres Clin Gastroenterol 10:151–64.
Rashid MG, Sanda MG, Vallorosi CJ, et al. (2001) Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate. Cancer Res 61:489–92.
Ratheesh A, Gomez GA, Priya R, et al. (2012) Centralspindlin and α-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. Nat Cell Biol 14:818–28. doi: 10.1038/ncb2532
Raufman J-P, Samimi R, Shah N, et al. (2008) Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. Cancer Res 68:3573–3578. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6810
Regard JB, Cherman N, Palmer D, et al. (2011) Wnt/β-catenin signaling is differentially regulated by Gα proteins and contributes to fibrous dysplasia. Proc Natl Acad Sci U S A 108:20101–6. doi: 10.1073/pnas.1114656108
Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, et al. (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. EMBO J 24:742–52. doi: 10.1038/sj.emboj.7600548
Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJPM, et al. (2002) Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. Int J Colorectal Dis 17:317–26. doi: 10.1007/s00384-002-0409-4
Reya T, Clevers H (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 434:843–50. doi: 10.1038/nature03319
Rieken S, Sassmann A, Herroeder S, et al. (2006) G12/G13 family G proteins regulate marginal zone B cell maturation, migration, and polarization. J Immunol 177:2985–93.
Riese J, Yu X, Munnerlyn A, et al. (1997) LEF-1 , a Nuclear Factor Coordinating Signaling Inputs from wingless and decapentaplegic. 88:777–787.
Riggleman B, Schedl P, Wieschaus E (1990) Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. Cell 63:549–560. doi: 10.1016/0092-8674(90)90451-J
Rimm DL, Kebriaei P, Morrow JS (1994) Molecular cloning reveals alternative splice forms of human alpha(E)-catenin. Biochem Biophys Res Commun 203:1691–9. doi: 10.1006/bbrc.1994.2381
Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, et al. (2003) The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. J Biol Chem 278:1372–9. doi: 10.1074/jbc.M208772200
Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. (2000) Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. Am J Hum Genet 66:1863–1870. doi: 10.1086/302913
Roczniak-Ferguson A, Reynolds AB (2003) Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. J Cell Sci 116:4201–12. doi: 10.1242/jcs.00724
Rørth P (2009) Collective cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol 25:407–29. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113231
Roura S, Miravet S, Piedra J, et al. (1999) Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 274:36734–40.
Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, et al. (2005) The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. Dig Dis Sci 50:42–6.
Rubinstein MR, Wang X, Liu W, et al. (2013) Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell Host Microbe 14:195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012
Ruzov A, Hackett JA, Prokhortchouk A, et al. (2009) The interaction of xKaiso with xTcf3: a revised model for integration of epigenetic and Wnt signalling pathways. Development 136:723–7. doi: 10.1242/dev.025577
Ryniers F, Stove C, Goethals M, et al. (2002) Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. Biol Chem 383:159–65. doi: 10.1515/BC.2002.016
Sadot E, Simcha I, Shtutman M, et al. (1998) Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15339–44.
Saito T, Masuda N, Miyazaki T, et al. (2004) Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. Oncol Rep 11:605–11.
Salahshor S, Naidoo R, Serra S, et al. (2008) Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. Mod Pathol 21:271–81. doi: 10.1038/modpathol.3800990
Sallee JL, Wittchen ES, Burridge K (2006) Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion. J Biol Chem 281:16189–92. doi: 10.1074/jbc.R600003200
Sandow MJ, Whitehead R (1979) The Paneth cell. Gut 20:420–31.
Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, et al. (1999) Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. Am J Physiol 277:G391–9.
Santos J, Yates D, Guilarte M, et al. (2008) Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. Psychoneuroendocrinology 33:1248–56. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.07.002
Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al. (2007) Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. J Clin Oncol 25:3238–45. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5956
Sato K, Watanabe T, Wang S, et al. (2011) Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. Mol Biol Cell 22:3103–19. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0274
Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH (1997) Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 273:G486–490.
Schackmann RCJ, Tenhagen M, van de Ven RAH, Derksen PWB (2013) p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. J Cell Sci 126:3515–25. doi: 10.1242/jcs.134411
Schepers A, Clevers H (2012) Wnt signaling, stem cells, and cancer of the gastrointestinal tract. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a007989. doi: 10.1101/cshperspect.a007989

Schimanski CC, Schmitz G, Kashyap A, et al. (2005) Reduced expression of Hugl-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. Oncogene 24:3100–9. doi: 10.1038/sj.onc.1208520
Schmidt M, Paes K, De Mazière A, et al. (2007) EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. Development 134:2913–23. doi: 10.1242/dev.002576
Schneikert J, Behrens J (2007) The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. Gut 56:417–25. doi: 10.1136/gut.2006.093310
Schrag D (2004) The price tag on progress--chemotherapy for colorectal cancer. N Engl J Med 351:317–9. doi: 10.1056/NEJMp048143
Schreider C, Peignon G, Thenet S, et al. (2002) Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. J Cell Sci 115:543–52.
Schubbert S, Shannon K, Bollag G (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 7:295–308. doi: 10.1038/nrc2109
Schuhmacher C, Becker I, Oswald S, et al. (1999) Loss of immunohistochemical E-cadherin expression in colon cancer is not due to structural gene alterations. Virchows Arch 434:489–95.
Schuller HM (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? Nat Rev Cancer 9:195–205. doi: 10.1038/nrc2590
Scott JA, Yap AS (2006) Cinderella no longer: alpha-catenin steps out of cadherin″s shadow. J Cell Sci 119:4599–605. doi: 10.1242/jcs.03267
Scott RJ, van der Luijt R, Spycher M, et al. (1995) Novel germline APC gene mutation in a large familial adenomatous polyposis kindred displaying variable phenotypes. Gut 36:731–6.
Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. Genes Dev 17:7–30. doi: 10.1101/gad.1039703
Sebbagh M, Santoni M-J, Hall B, et al. (2009) Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin. Curr Biol 19:37–42. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.033
Serban DE (2014) Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. Cancer Lett 345:258–270. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.013
Serra S, Salahshor S, Fagih M, et al. (2007) Nuclear expression of E-cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas. JOP 8:296–303.
Serrels A, Canel M, Brunton VG, Frame MC Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: insights from in vivo imaging. Cell Adh Migr 5:360–5.
Serres M, Grangeasse C, Haftek M, et al. (1997) Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. Exp Cell Res 231:163–72. doi: 10.1006/excr.1996.3443
Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, et al. (1993) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. Cancer Res 53:3712–8.
Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman J-P (2009) Muscarinic receptors and ligands in cancer. Am J Physiol Cell Physiol 296:C221–32. doi: 10.1152/ajpcell.00514.2008
Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S, et al. (2006) The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. Mol Cell 21:799–809. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.037
Shahbazi MN, Megias D, Epifano C, et al. (2013) CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions. J Cell Biol 203:1043–61. doi: 10.1083/jcb.201306019
Sheinin Y, Kaserer K, Wrba F, et al. (2000) In situ mRNA hybridization analysis and immunolocalization of the vitamin D receptor in normal and carcinomatous human colonic mucosa: relation to epidermal growth factor receptor expression. Virchows Arch 437:501–507. doi: 10.1007/s004280000275
Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, et al. (2005) Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. Mol Biol Cell 16:4531–42. doi: 10.1091/mbc.E05-04-0330
Shi Y, Sawada J, Sui G, et al. (2003) Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. Nature 422:735–8. doi: 10.1038/nature01550
Shibata T, Kokubu A, Sekine S, et al. (2004) Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. Am J Pathol 164:2269–78. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63783-2
Shih DQ, Targan SR, McGovern D (2008) Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. Curr Gastroenterol Rep 10:568–75.
Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, et al. (2008) Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. J Cell Biol 180:1277–89. doi: 10.1083/jcb.200708137
Shioiri M, Shida T, Koda K, et al. (2006) Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. Br J Cancer 94:1816–22. doi: 10.1038/sj.bjc.6603193
Shitashige M, Satow R, Honda K, et al. (2008) Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex. Gastroenterology 134:1961–71, 1971.e1–4. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.010
Shorning BY, Zabkiewicz J, McCarthy A, et al. (2009) Lkb1 deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small intestine. PLoS One 4:e4264. doi: 10.1371/journal.pone.0004264
Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, et al. (2012) Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. Physiol Rev 92:273–366. doi: 10.1152/physrev.00005.2011
Simo P, Simon-Assmann P, Bouziges F, et al. (1991) Changes in the expression of laminin during intestinal development. Development 112:477–87.
Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, et al. (1995) Extracellular matrix components in intestinal development. Experientia 51:883–900.
Smalley-Freed WG, Efimov A, Short SP, et al. (2011) Adenoma formation following limited ablation of p120-catenin in the mouse intestine. PLoS One 6:e19880. doi: 10.1371/journal.pone.0019880

Smutny M, Cox HL, Leerberg JM, et al. (2010) Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. Nat Cell Biol 12:696–702. doi: 10.1038/ncb2072
Soncin F, Mohamet L, Eckardt D, et al. (2009) Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. Stem Cells 27:2069–80. doi: 10.1002/stem.134
Song P, Sekhon HS, Lu A, et al. (2007) M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion. Cancer Res 67:3936–44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2484
Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, et al. (2006) Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. Biochem Biophys Res Commun 343:69–76. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.080
Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer Res 58:1130–4.
Spasic D, Annaert W (2008) Building gamma-secretase: the bits and pieces. J Cell Sci 121:413–20. doi: 10.1242/jcs.015255
Spring CM, Kelly KF, O'Kelly I, et al. (2005) The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. Exp Cell Res 305:253–65. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.01.007
Stairs DB, Bayne LJ, Rhoades B, et al. (2011) Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene. Cancer Cell 19:470–83. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.007
Steinhusen U, Weiske J, Badock V, et al. (2001) Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. J Biol Chem 276:4972–4980. doi: 10.1074/jbc.M006102200
Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J (2008) Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. Oncogene 27:5075–80. doi: 10.1038/onc.2008.140
Stoker AW (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. J Endocrinol 185:19–33. doi: 10.1677/joe.1.06069
Strathdee G (2002) Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. Semin Cancer Biol 12:373–9.
Strathmann MP, Simon MI (1991) G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. Proc Natl Acad Sci U S A 88:5582–6.
Stresemann C, Brueckner B, Musch T, et al. (2006) Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. Cancer Res 66:2794–800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2821
Strumane K, Bonnomet A, Stove C, et al. (2006) E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion. Cancer Res 66:10007–15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3096
Stutzmann J, Bellissent-Waydelich A, Fontao L, et al. (2000) Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. Microsc Res Tech 51:179–90. doi: 10.1002/1097-0029(20001015)51:2<179::AID-JEMT9>3.0.CO;2-4
Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014) DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. Front Oncol 4:80. doi: 10.3389/fonc.2014.00080
Sui XF, Kiser TD, Hyun SW, et al. (2005) Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. Am J Pathol 166:1247–1258.
Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB (2002) A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. Cancer Cell 2:301–14.
Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, et al. (2004) aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. Curr Biol 14:1425–35. doi: 10.1016/j.cub.2004.08.021
Swinny JD, Valentino RJ (2006) Corticotropin-releasing factor promotes growth of brain norepinephrine neuronal processes through Rho GTPase regulators of the actin cytoskeleton in rat. Eur J Neurosci 24:2481–90. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05129.x
Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, et al. (2007) Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. Cancer Res 67:2030–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2808
Taguchi K, Ishiuchi T, Takeichi M (2011) Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. J Cell Biol 194:643–56. doi: 10.1083/jcb.201104124
Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
Takai N, Desmond JC, Kumagai T, et al. (2004) Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. Clin Cancer Res 10:1141–9.
Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y (2008a) The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. Annu Rev Cell Dev Biol 24:309–42. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175339
Takai Y, Irie K, Shimizu K, et al. (2003) Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. Cancer Sci 94:655–67.
Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H (2008b) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. Nat Rev Mol Cell Biol 9:603–15. doi: 10.1038/nrm2457
Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, et al. (2004) Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. Cancer Lett 212:253–9. doi: 10.1016/j.canlet.2004.03.016
Takeichi M (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development 102:639–55.
Takeichi M (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. Curr Opin Cell Biol 7:619–27.
Takeichi M (2007) The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. Nat Rev Neurosci 8:11–20. doi: 10.1038/nrn2043
Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE (1993) Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. J Clin Invest 91:53–60. doi: 10.1172/JCI116200
Tanaka MN, Diaz BL, de Souza W, Morgado-Diaz JA (2008) Prostaglandin E2-EP1 and EP2 receptor signaling promotes apical junctional complex disassembly of Caco-2 human colorectal cancer cells. BMC Cell Biol 9:63. doi: 10.1186/1471-2121-9-63
Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, et al. (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci 94:965–73.
Tang VW, Brieher WM (2012) α-Actinin-4/FSGS1 is required for Arp2/3-dependent actin assembly at the adherens junction. J Cell Biol 196:115–30. doi: 10.1083/jcb.201103116

Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, et al. (2007) Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. Nat Med 13:1299–307. doi: 10.1038/nm1652
Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF (2005) The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. Cancer Res 65:5996–6000; discussion 6000–1. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0699
Tarmin L, Yin J, Harpaz N, et al. (1995) Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. Cancer Res 55:2035–8.
Teller IC, Beaulieu J-F (2004) Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. Expert Rev Mol Med 3:1–18. doi: 10.1017/S1462399401003623
Ten Klooster JP, Jansen M, Yuan J, et al. (2009) Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex. Dev Cell 16:551–562. doi: S1534-5807(09)00044-6 [pii] 10.1016/j.devcel.2009.01.016
Terg R, Sambuelli A, Coronel E, et al. (2008) Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. A large prospective study. Acta Gastroenterol Latinoam 38:26–33.
Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 398:422–6. doi: 10.1038/18884
Theveneau E, Mayor R (2013) Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells. Cell Mol Life Sci 70:3481–92. doi: 10.1007/s00018-012-1251-7
Theveneau E, Mayor R (2012) Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. Curr Opin Cell Biol 24:677–84. doi: 10.1016/j.ceb.2012.08.002
Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 139:871–90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol 7:131–42. doi: 10.1038/nrm1835
Thoreson M a, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. (2000) Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. J Cell Biol 148:189–202.
Thoreson MA, Reynolds AB (2002) Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. Differentiation 70:583–9. doi: 10.1046/j.1432-0436.2002.700911.x
Thorne J, Campbell MJ (2008) The vitamin D receptor in cancer. Proc Nutr Soc 67:115–27. doi: 10.1017/S0029665108006964
Timpl R (1996) Macromolecular organization of basement membranes. Curr Opin Cell Biol 8:618–24.
Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G (2012) EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. Semin Cancer Biol 22:194–207. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.013
Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G (2010) Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. Gastroenterology 138:2151–62. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.063
Tomschy a, Fauser C, Landwehr R, Engel J (1996) Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. EMBO J 15:3507–14.
Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. Nat Rev Mol Cell Biol 7:833–46. doi: 10.1038/nrm2039
Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL (2002) Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. J Biol Chem 277:32905–14. doi: 10.1074/jbc.M200300200
Troyanovsky RB, Klingelhöfer J, Troyanovsky SM (2011) α-Catenin contributes to the strength of E-cadherin-p120 interactions. Mol Biol Cell 22:4247–55. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0250
Trzpis M, McLaughlin PM, van Goor H, et al. (2008) Expression of EpCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. J Pathol 216:201–8. doi: 10.1002/path.2396
Tsuji T, Ibaragi S, Hu G (2009) Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. Cancer Res 69:7135–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618
Tsukatani Y, Suzuki K, Takahashi K (1997) Loss of density-dependent growth inhibition and dissociation of alpha-catenin from E-cadherin. J Cell Physiol 173:54–63. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199710)173:1<54::AID-JCP7>3.0.CO;2-I
Turck N, Gross I, Gendry P, et al. (2005) Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. Exp Cell Res 303:494–503. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.10.025
Turck N, Lefebvre O, Gross I, et al. (2006) Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. J Cell Physiol 206:545–55. doi: 10.1002/jcp.20501
Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, et al. (2006) Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. Neurosci Lett 402:278–83. doi: 10.1016/j.neulet.2006.04.018
Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ (2000) SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. J Biol Chem 275:5983–5986.
Utton MA, Eickholt B, Howell F V, et al. (2001) Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. J Neurochem 76:1421–30.
Valentin G, Haas P, Gilmour D (2007) The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. Curr Biol 17:1026–31. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.020
Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M (2001) Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. Virchows Arch 439:725–51.
Van Aken J, Cuvelier CA, De Wever N, et al. (1993) Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in human colorectal tumours. Pathol Res Pract 189:975–8. doi: 10.1016/S0344-0338(11)80667-9
Van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, et al. (1997) Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. Cell 88:789–99.
Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell 111:241–50.

Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, et al. (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology 131:117–29. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020
Van Grunsven LA, Michiels C, Van de Putte T, et al. (2003) Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin. J Biol Chem 278:26135–45. doi: 10.1074/jbc.M300597200
Van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F (1999) Nuclear localization of the p120ctn Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. Proc Natl Acad Sci 96:7980–7985. doi: 10.1073/pnas.96.14.7980
Van Roy F (2014) Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. Nat Rev Cancer 14:121–34. doi: 10.1038/nrc3647
Vandenberg P, Kern A, Ries A, et al. (1991) Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. J Cell Biol 113:1475–83.
Vasanth S, ZeRuth G, Kang HS, Jetten AM (2011) Identification of nuclear localization, DNA binding, and transactivating mechanisms of Kruppel-like zinc finger protein Gli-similar 2 (Glis2). J Biol Chem 286:4749–59. doi: 10.1074/jbc.M110.165951
Vasioukhin V, Fuchs E (2001) Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. Curr Opin Cell Biol 13:76–84.
Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, et al. (2007) Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. Cancer Res 67:6844–53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0929
Viloria-Petit AM, David L, Jia JY, et al. (2009) A role for the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A 106:14028–33. doi: 10.1073/pnas.0906796106
Viré E, Brenner C, Deplus R, et al. (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature 439:871–4. doi: 10.1038/nature04431
Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, et al. (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. Cancer Cell 9:225–38. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.023
Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 8:755–68. doi: 10.1038/nrc2499
Vitorino P, Meyer T (2008) Modular control of endothelial sheet migration. Genes Dev 22:3268–81. doi: 10.1101/gad.1725808
Vogelmann R, Nguyen-Tat M-D, Giehl K, et al. (2005) TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. J Cell Sci 118:4901–12. doi: 10.1242/jcs.02594
Volberg T, Zick Y, Dror R, et al. (1992) The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. EMBO J 11:1733–42.
Von Rosenvinge EC, Raufman J-P (2011) Muscarinic receptor signaling in colon cancer. Cancers (Basel) 3:971–81. doi: 10.3390/cancers3010971
Wada R (2009) Proposal of a new hypothesis on the development of colorectal epithelial neoplasia: nonspecific inflammation--colorectal Paneth cell metaplasia--colorectal epithelial neoplasia. Digestion 79 Suppl 1:9–12. doi: 10.1159/000167860
Wagner J, Gordon LA, Heng HH, et al. (1996) Physical mapping of receptor type protein tyrosine phosphatase sigma (PTPRS) to human chromosome 19p13.3. Genomics 38:76–78. doi: 10.1006/geno.1996.0594
Wang F, Graham WV, Wang Y, et al. (2005) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. Am J Pathol 166:409–19.
Wang H, Radjendirane V, Wary KK, Chakrabarty S (2004) Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells. Oncogene 23:5558–61. doi: 10.1038/sj.onc.1207701
Wang J, Li S (2007) Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? Biochem Biophys Res Commun 362:785–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.014
Wang J, Xu Y, Xu Y, et al. (2008) Urocortin″s inhibition of tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma via corticotrophin-releasing factor receptor 2. Cancer Invest 26:359–68. doi: 10.1080/07357900701788106
Wang J, Yu J-C, Kang W-M, et al. (2012) The predictive effect of cadherin-17 on lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. Ann Surg Oncol 19:1529–34. doi: 10.1245/s10434-011-2115-3
Wang Q, Chen X-W, Margolis B (2007) PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. Mol Biol Cell 18:874–85. doi: 10.1091/mbc.E06-07-0651
Wang Y, Minshall RD, Schwartz DE, Hu G (2011) Cyclic stretch induces alveolar epithelial barrier dysfunction via calpain-mediated degradation of p120-catenin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301:L197–206. doi: 10.1152/ajplung.00048.2011
Wang Y, Shang Y (2013) Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis. Exp Cell Res 319:160–9. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.07.019
Wang Z, Li SS-C Numb: A new player in EMT. Cell Adh Migr 4:176–9.
Wang Z, Sandiford S, Wu C, Li SS-C (2009) Numb regulates cell-cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling. EMBO J 28:2360–73. doi: 10.1038/emboj.2009.190
Watanabe N, Kato T, Fujita A, et al. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. Nat Cell Biol 1:136–43. doi: 10.1038/11056
Watanabe T, Sato K, Kaibuchi K (2009) Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases. Cold Spring Harb Perspect Biol 1:a003020. doi: 10.1101/cshperspect.a003020
Wee EJH, Peters K, Nair SS, et al. (2012) Mapping the regulatory sequences controlling 93 breast cancer-associated miRNA genes leads to the identification of two functional promoters of the Hsa-mir-200b cluster, methylation of which is associated with metastasis or hormone receptor status in adva. Oncogene 31:4182–95. doi: 10.1038/onc.2011.584
Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF (2005) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn″s disease. J Leukoc Biol 77:460–5. doi: 10.1189/jlb.0904543
Wendeler MW, Drenckhahn D, Gessner R, Baumgartner W (2007) Intestinal LI-cadherin acts as a Ca2+-dependent adhesion switch. J Mol Biol 370:220–30. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.062

Wessler I, Kirkpatrick CJ (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. Br J Pharmacol 154:1558–71. doi: 10.1038/bjp.2008.185
Wever O De, Derycke ÆL, Hendrix ÆA, et al. (2007) Soluble cadherins as cancer biomarkers. 685–697. doi: 10.1007/s10585-007-9104-8
Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, et al. (2001) Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. Gut 48:367–71.
Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH (1987) Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. J Cell Biochem 34:187–202. doi: 10.1002/jcb.240340305
Whittard JD, Craig SE, Mould AP, et al. (2002) E-cadherin is a ligand for integrin alpha2beta1. Matrix Biol 21:525–32.
Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, et al. (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. Cell 127:1027–39. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.046
Williams E, Williams G, Gour BJ, et al. (2000) A novel family of cyclic peptide antagonists suggests that N-cadherin specificity is determined by amino acids that flank the HAV motif. J Biol Chem 275:4007–12.
Williams EJ, Williams G, Howell F V, et al. (2001) Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. J Biol Chem 276:43879–86. doi: 10.1074/jbc.M105876200
Williams G, Williams E-J, Doherty P (2002) Dimeric versions of two short N-cadherin binding motifs (HAVDI and INPISG) function as N-cadherin agonists. J Biol Chem 277:4361–7. doi: 10.1074/jbc.M109185200
Wilson AJ, Byun D-S, Nasser S, et al. (2008) HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. Mol Biol Cell 19:4062–75. doi: 10.1091/mbc.E08-02-0139
Wilson AJ, Byun D-S, Popova N, et al. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. J Biol Chem 281:13548–58. doi: 10.1074/jbc.M510023200
Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E (1995) Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. Cell 82:67–76.
Won J, Kim H, Park EJ, et al. (1999) Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. Cancer Res 59:1273–7.
Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, et al. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. J Clin Gastroenterol 40:235–43.
Wray J, Hartmann C (2012) WNTing embryonic stem cells. Trends Cell Biol 22:159–68. doi: 10.1016/j.tcb.2011.11.004
Wu K, Feskanich D, Fuchs CS, et al. (2007) A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. J Natl Cancer Inst 99:1120–9. doi: 10.1093/jnci/djm038
Wu S, Li RW, Li W, Li C-J (2012) Transcriptome characterization by RNA-seq unravels the mechanisms of butyrate-induced epigenomic regulation in bovine cells. PLoS One 7:e36940. doi: 10.1371/journal.pone.0036940
Wu Y, Vendome J, Shapiro L, et al. (2011) Transforming binding affinities from three dimensions to two with application to cadherin clustering. Nature 475:510–3. doi: 10.1038/nature10183
Xiao K, Garner J, Buckley KM, et al. (2005) p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. Mol Biol Cell 16:5141–5151. doi: 10.1091/mbc.E05-05-0440
Xie G, Cheng K, Shant J, Raufman J-P (2009) Acetylcholine-induced activation of M3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296:G755–63. doi: 10.1152/ajpgi.90519.2008
Xu H, Posner GH, Stevenson M, Campbell FC (2010) Apc(MIN) modulation of vitamin D secosteroid growth control. Carcinogenesis 31:1434–41. doi: 10.1093/carcin/bgq098
Xu M, Yamada M, Li M, et al. (2007) FadA from Fusobacterium nucleatum utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. J Biol Chem 282:25000–25009. doi: 10.1074/jbc.M611567200
Yamada S, Nelson WJ (2007) Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. J Cell Biol 178:517–27. doi: 10.1083/jcb.200701058
Yamada S, Pokutta S, Drees F, et al. (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. Cell 123:889–901. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.020
Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, et al. (2003) Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. Curr Biol 13:734–43.
Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 67:10831–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0908
Yamazaki D, Oikawa T, Takenawa T (2007) Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. J Cell Sci 120:86–100. doi: 10.1242/jcs.03311
Yanagisawa M, Huveldt D, Kreinest P, et al. (2008) A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. J Biol Chem 283:18344–54. doi: 10.1074/jbc.M801192200
Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, et al. (2004) A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. J Biol Chem 279:9512–21. doi: 10.1074/jbc.M310895200
Yang WL, Frucht H (2000) Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. Carcinogenesis 21:1789–1793.
Yang Y, Park H, Yang Y, et al. (2007) Enhancement of cell migration by corticotropin-releasing hormone through ERK1/2 pathway in murine melanoma cell line, B16F10. Exp Dermatol 16:22–7. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00511.x
Yang Y-A, Dukhanina O, Tang B, et al. (2002) Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. J Clin Invest 109:1607–15. doi: 10.1172/JCI15333
Yee KWL, Minden MD BJ (2007) Phase I Trial of Two Sequence-Specific Schedules Annual, of Decitabine and Vorinostat in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). ASH Annu. Meet. Abstr. 110:908:
Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, et al. (2010) alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. Nat Cell Biol 12:533–42. doi: 10.1038/ncb2055

Yori JL, Johnson E, Zhou G, et al. (2010) Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression. J Biol Chem 285:16854–63. doi: 10.1074/jbc.M110.114546
Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, et al. (1995) Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 92:7416–9.
Yuan P-Q, Wu S V, Wang L, Taché Y (2010a) Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin. Peptides 31:322–31. doi: 10.1016/j.peptides.2009.11.012
Yuan W, Chen Z, Wu S, et al. (2009) Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis. Pathol Oncol Res 15:473–8. doi: 10.1007/s12253-008-9132-y
Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, et al. (2010b) Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. Mol Cell Endocrinol 325:1–7. doi: 10.1016/j.mce.2010.04.013
Zaidel-Bar R (2013) Cadherin adhesome at a glance. J Cell Sci 126:373–8. doi: 10.1242/jcs.111559
Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma˝ayan A, et al. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. Nat Cell Biol 9:858–67. doi: 10.1038/ncb0807-858
Zandy NL, Pendergast AM (2008) Abl tyrosine kinases modulate cadherin-dependent adhesion upstream and downstream of Rho family GTPases. Cell Cycle 7:444–8.
Zandy NL, Playford M, Pendergast AM (2007) Abl tyrosine kinases regulate cell-cell adhesion through Rho GTPases. Proc Natl Acad Sci U S A 104:17686–91. doi: 10.1073/pnas.0703077104
Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaiken M, et al. (1999) E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. Cell Growth Differ 10:629–38.
Zbar AP, Simopoulos C, Karayiannakis AJ (2004) Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. J Gastroenterol 39:413–21. doi: 10.1007/s00535-004-1335-8
Zen K, Yasui K, Gen Y, et al. (2009) Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. Oncogene 28:2910–8. doi: 10.1038/onc.2009.148
Zhang B, Groffen J, Heisterkamp N (2007) Increased resistance to a farnesyltransferase inhibitor by N-cadherin expression in Bcr/Abl-P190 lymphoblastic leukemia cells. Leukemia 21:1189–97. doi: 10.1038/sj.leu.2404667
Zhang Y, Sivasankar S, Nelson WJ, Chu S (2009) Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. Proc Natl Acad Sci U S A 106:109–14. doi: 10.1073/pnas.0811350106
Zondag GC, Moolenaar WH (1997) Receptor protein tyrosine phosphatases: involvement in cell-cell interaction and signaling. Biochimie 79:477–83.
Zou H-Z, Yu B-M, Wang Z-W, et al. (2002) Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. Clin Cancer Res 8:188–91.
Shapiro 1995, structural basis of cell-cell adhesion.pdf.

Bibliographie

Bibliographie

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3797–804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797

Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., & Hoschuetzky, H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *Journal of Cell Science*, *107 (Pt 1*, 3655–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7706414

Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R., & Hoschuetzky, H. (1996). Single Amino Acid Substitutions in Proteins of the armadillo Gene Family Abolish Their Binding to -Catenin Single Amino Acid Substitutions in Proteins of the armadillo Gene Family Abolish Their Binding to ␣ -Catenin *. *The Journal of Biological Chemistry*.

Aho, S., Rothenberger, K., & Uitto, J. (1999). Human p120 ctn Catenin : Tissue-Specific Expression of Isoforms and Molecular Interactions With BP180 / Type XVII Collagen. *Journal of Cellular Biochemistry*, *399*, 390–399.

Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., & Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nature Cell Biology*, *2*(9), 637–44. doi:10.1038/35023588

Anastasiadis, P. Z., & Reynolds, a B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science*, *113 (Pt 8*, 1319–34. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725216

André, F., Rigot, V., Thimonier, J., Montixi, C., Parat, F., Pommier, G., … Luis, J. (1999). Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *83*(4), 497–505. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508486

Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andreakou, E., … Tsatsanis, C. (2009). Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Molecular Cancer*, *8*, 30. doi:10.1186/1476-4598-8-30

Anlauf, M., Schäfer, M. K.-H., Eiden, L., & Weihe, E. (2003). Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *The Journal of Comparative Neurology*, *459*(1), 90–111. doi:10.1002/cne.10599

Antoni, M. H., Cruess, D. G., Klimas, N., Carrico, A. W., Maher, K., Cruess, S., … Schneiderman, N. (2005). Increases in a marker of immune system reconstitution are predated by decreases in 24-h urinary cortisol output and depressed mood during a 10-week stress management intervention in symptomatic HIV-infected men. *Journal of Psychosomatic Research*, *58*(1), 3–13. doi:10.1016/j.jpsychores.2004.05.010

Arck, P. C., Slominski, A., Theoharides, T. C., Peters, E. M. J., & Paus, R. (2006). Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(8), 1697–704. doi:10.1038/sj.jid.5700104

Arranz, A., Venihaki, M., Mol, B., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Rassouli, O., … Tsatsanis, C. (2010). The impact of stress on tumor growth: peripheral CRF mediates tumor-promoting effects of stress. *Molecular Cancer*, *9*, 261. doi:10.1186/1476-4598-9-261

Augeron, C., & Laboisse, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Research*, *44*(9), 3961–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6744312

Aumailley, M., & Krieg, T. (1996). Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *The Journal of Investigative Dermatology*, *106*(2), 209–214.

Austin, G. L., Adair, L. S., Galanko, J. A., Martin, C. F., Satia, J. A., & Sandler, R. S. (2007). A diet high in fruits and low in meats reduces the risk of colorectal adenomas. *The Journal of Nutrition*, *137*(4), 999–1004. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374667

Avizienyte, E., Fincham, V. J., Brunton, V. G., & Frame, M. C. (2004). Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(6), 2794–803. doi:10.1091/mbc.E03-12-0879

Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., & Frame, M. C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nature Cell Biology*, *4*(8), 632–8. doi:10.1038/ncb829

Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., … Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, *182*(4), 685–701. doi:10.1083/jcb.200803137

Bach-Ngohou, K., Mahé, M. M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., … Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *The Journal of Physiology*, *588*(Pt 14), 2533–44. doi:10.1113/jphysiol.2010.188409

Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., … Robakis, N. K. (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(5), 2381–6. doi:10.1073/pnas.041603398

Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(5), 361–71. doi:10.1038/nrc2628

Bao, Y., Alexopoulos, G. S., Casalino, L. P., Ten Have, T. R., Donohue, J. M., Post, E. P., … Bruce, M. L. (2011). Collaborative depression care management and disparities in depression treatment and outcomes. *Archives of General Psychiatry*, *68*(6), 627–36. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.55

Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 269–80. doi:10.1007/s00441-009-0834-6

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., … Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(7165), 1003–7. doi:10.1038/nature06196

Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., … Bueno, L. (2007). Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *The Journal of Physiology*, *580*(Pt 1), 347–56. doi:10.1113/jphysiol.2006.120907

Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., & Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut*, *53*(4), 501–6. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1774003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Basora, N., Herring-Gillam, F. E., Boudreau, F., Perreault, N., Pageot, L. P., Simoneau, M., … 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(42), 29819–25.

Basson, M. D., Emenaker, N. J., & Sanders, M. A. (2000). Alpha integrin subunits regulate human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation and phenotype. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *10*(1-2), 27–36. doi:16332

Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M. W., Sancho, E., Huls, G., … Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, *111*(2), 251–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408869

Beaulieu, J. F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *4*, D310–21.

Beaulieu, J. F., & Quaroni, A. (1991). Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *The Biochemical Journal*, *280 (Pt 3*, 599–608. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1130497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Becker, C., Fantini, M. C., & Neurath, M. F. (2006). TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *17*(1-2), 97–106. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.004

Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2012). Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Reviews*, *31*(3-4), 673–87. doi:10.1007/s10555-012-9370-z

Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, *382*(6592), 638–42. doi:10.1038/382638a0

Bellovin, D. I., Bates, R. C., Muzikansky, A., Rimm, D. L., & Mercurio, A. M. (2005). Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Research*, *65*(23), 10938–45. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1947

Benbrook, D. M., & Long, A. (2012). Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Experimental Oncology*, *34*(3), 286–97.

Berg, D. J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., … Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(4), 1010–20. doi:10.1172/JCI118861

Bergogne-Bérézin, E. (1995). [Ecologic impact of antibiotherapy. Role of substitution microorganisms in the control of antibiotic-related diarrhea and colitis]. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, *24*(2), 145–8, 151–2, 155–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7899347

Bernik, T. R. (2002). Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway . *J. Exp. Med.* . Retrieved from http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.45.5228

Bernstein CN, El-Gabalawy H, Sargent M, L. C., & Rawsthorne P, Elias B, T. S. (2011). Assessing inflammatory First, bowel disease-associated antibodies in Caucasian and Nations cohorts. *Can J Gastroenterol*, *25*(269-273).

Betson, M., Lozano, E., Zhang, J., & Braga, V. M. M. (2002). Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(40), 36962–9. doi:10.1074/jbc.M207358200

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., … Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, *441*(7090), 235–8. doi:10.1038/nature04753

Bhatia, V., & Tandon, R. K. (2005). Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *20*(3), 332–9. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03508.x

Bienz, M. (2005). beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Current Biology : CB*, *15*(2), R64–7. doi:10.1016/j.cub.2004.12.058

Birchmeier, W., Hülsken, J., & Behrens, J. (1995). Adherens junction proteins in tumour progression. *Cancer Surveys*, *24*, 129–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553658

Bittencourt, J. C., & Sawchenko, P. E. (2000). Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(3), 1142–56. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648719

Bjerknes, M., & Cheng, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *The American Journal of Anatomy*, *160*(1), 51–63. doi:10.1002/aja.1001600105

Bjerknes, M., & Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*, *116*(1), 7–14. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869596

Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S., & Pouliot, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Developmental Biology*, *139*(1), 227–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328837

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., & Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5571), 1308–13. doi:10.1126/science.1071559

Boivin, G. P., Washington, K., Yang, K., Ward, J. M., Pretlow, T. P., Russell, R., … Coffey, R. J. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology*, *124*(3), 762–77. doi:10.1053/gast.2003.50094

Bonaz, B., & Rivest, S. (1998). Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *The American Journal of Physiology*, *275*(5 Pt 2), R1438–49. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791059

Boorse, G. C., & Denver, R. J. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and Comparative Endocrinology*, *146*(1), 9–18. doi:10.1016/j.ygcen.2005.11.014

Borovikova, L. V. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin . *Nature* . Retrieved from http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.37.4458

Borovikova, L. V, Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M., & Tracey, K. J. (2000). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, *85*(1-3), 141–7. doi:10.1016/S1566-0702(00)00233-2

Borovikova, L. V, Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., … Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, *405*(6785), 458–62. doi:10.1038/35013070

Boucher, M.-J., Laprise, P., & Rivard, N. (2005). Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, *202*(1), 178–90. doi:10.1002/jcp.20104

Boudry, G., Jury, J., Yang, P. C., & Perdue, M. H. (2007). Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*(5), G1228–32. doi:10.1152/ajpgi.00358.2006

Boyko, E. J., Koepsell, T. D., Perera, D. R., & Inui, T. S. (1987). Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *The New England Journal of Medicine*, *316*(12), 707–10. doi:10.1056/NEJM198703193161202

Brasch, J., Harrison, O. J., Honig, B., & Shapiro, L. (2012). Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, *22*(6), 299–310. doi:10.1016/j.tcb.2012.03.004

Brown, K. C., Lau, J. K., Dom, A. M., Witte, T. R., Luo, H., Crabtree, C. M., … Dasgupta, P. (2012). MG624, an α7-nAChR antagonist, inhibits angiogenesis via the Egr-1/FGF2 pathway. *Angiogenesis*, *15*(1), 99–114. doi:10.1007/s10456-011-9246-9

Buckinx, R., Adriaensen, D., Nassauw, L. Van, & Timmermans, J.-P. (2011). Corticotrophin-releasing factor, related peptides, and receptors in the normal and inflamed gastrointestinal tract. *Frontiers in Neuroscience*, *5*, 54. doi:10.3389/fnins.2011.00054

Budd, D. C., McDonald, J., Emsley, N., Cain, K., & Tobin, A. B. (2003). The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(21), 19565–73. doi:10.1074/jbc.M211670200

Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., … Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*, *93*(2), 189–201. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568712

Buts, J. P., Bernasconi, P., Van Craynest, M. P., Maldague, P., & De Meyer, R. (1986). Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of Saccharomyces boulardii. *Pediatric Research*, *20*(2), 192–6. doi:10.1203/00006450-198602000-00020

Cadigan, K. M., & Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(2), a002881. doi:10.1101/cshperspect.a002881

Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., … Virgin, H. W. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, *456*(7219), 259–263. doi:10.1038/nature07416

Cadwell, K., Patel, K. K., Maloney, N. S., Liu, T.-C., Ng, A. C. Y., Storer, C. E., … Virgin, H. W. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*, *141*(7), 1135–45. doi:10.1016/j.cell.2010.05.009

Cameron, H. L., & Perdue, M. H. (2005). Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *314*(1), 214–20. doi:10.1124/jpet.105.085373

Cameron, H. L., & Perdue, M. H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *19*(1), 47–56. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x

Canonici, A., Pellegrino, E., Siret, C., Terciolo, C., Czerucka, D., Bastonero, S., … André, F. (2012). Saccharomyces boulardii improves intestinal epithelial cell restitution by inhibiting αvβ5 integrin activation state. *PloS One*, *7*(9), e45047. doi:10.1371/journal.pone.0045047

Canonici, A., Siret, C., Pellegrino, E., Pontier-Bres, R., Pouyet, L., Montero, M. P., … André, F. (2011). Saccharomyces boulardii improves intestinal cell restitution through activation of the α2β1 integrin collagen receptor. *PloS One*, *6*(3), e18427. doi:10.1371/journal.pone.0018427

Canonici, A., Steelant, W., Rigot, V., Khomitch-Baud, A., Boutaghou-Cherid, H., Bruyneel, E., … André, F. (2008). Insulin-like growth factor-I receptor, E-cadherin and alpha v integrin form a dynamic complex under the control of alpha-catenin. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *122*(3), 572–82. doi:10.1002/ijc.23164

Carroll, K. M., Wong, T. T., Drabik, D. L., & Chang, E. B. (1988). Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *The American Journal of Physiology*, *254*(3 Pt 1), G355–60.

Cassinotti, E., Melson, J., Liggett, T., Melnikov, A., Yi, Q., Replogle, C., … Levenson, V. (2012). DNA methylation patterns in blood of patients with colorectal cancer and adenomatous colorectal polyps. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *131*(5), 1153–7. doi:10.1002/ijc.26484

Castagliuolo, I., Lamont, J. T., Qiu, B., Fleming, S. M., Bhaskar, K. R., Nikulasson, S. T., … Pothoulakis, C. (1996). Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *The American Journal of Physiology*, *271*(5 Pt 1), G884–92. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944704

Castaño, J., Solanas, G., Casagolda, D., Raurell, I., Villagrasa, P., Bustelo, X. R., … Duñach, M. (2007). Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(5), 1745–57. doi:10.1128/MCB.01974-06

Chan, A. O. O., Chu, K.-M., Lam, S. K., Cheung, K. L., Law, S., Kwok, K.-F., … Wong, B. C.-Y. (2005). Early prediction of tumor recurrence after curative resection of gastric carcinoma by measuring soluble E-cadherin. *Cancer*, *104*(4), 740–6. doi:10.1002/cncr.21260

Chang, J., Adams, M. R., Clifton, M. S., Liao, M., Brooks, J. H., Hasdemir, B., & Bhargava, A. (2011). Urocortin 1 modulates immunosignaling in a rat model of colitis via corticotropin-releasing factor receptor 2. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *300*(5), G884–94. doi:10.1152/ajpgi.00319.2010

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., & Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Research*, *48*(7), 1936–42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349466

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., & Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*, *107 (Pt 1*, 213–25. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175910

Chartier, N. T., Lainé, M. G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., & Jacquier-Sarlin, M. R. (2011). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Experimental Cell Research*, *317*(10), 1422–36. doi:10.1016/j.yexcr.2011.03.009

Chartier, N. T., Lainé, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. a, Matos, P., … Jacquier-Sarlin, M. R. (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 1), 31–46. doi:10.1242/jcs.02698

Chartier, N. T., Oddou, C. I., Lainé, M. G., Ducarouge, B., Marie, C. a, Block, M. R., & Jacquier-Sarlin, M. R. (2007). Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Research*, *67*(20), 9781–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0233

Chatzaki, E., Crowe, P. D., Wang, L., Million, M., Taché, Y., & Grigoriadis, D. E. (2004). CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *Journal of Neurochemistry*, *90*(2), 309–16. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02490.x

Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Constantinidis, T. C., Papadopoulos, N., Taché, Y., Minopoulos, G., & Grigoriadis, D. E. (2006). Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, *209*(3), 905–11. doi:10.1002/jcp.20792

Che, C.-M., Li, C.-H., Chui, S. S.-Y., Roy, V. A. L., & Low, K.-H. (2008). Homoleptic copper(I) arylthiolates as a new class of p-type charge carriers: structures and charge mobility studies. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, *14*(10), 2965–75. doi:10.1002/chem.200700723

Chen, A. M., Perrin, M. H., Digruccio, M. R., Vaughan, J. M., Brar, B. K., Arias, C. M., … Vale, W. W. (2005). A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(7), 2620–5. doi:10.1073/pnas.0409583102

Chen, F. M., Bilezikjian, L. M., Perrin, M. H., Rivier, J., & Vale, W. (1986). Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Research*, *381*(1), 49–57. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3019476

Chen, H., Paradies, N. E., Fedor-Chaiken, M., & Brackenbury, R. (1997). E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *Journal of Cell Science*, *110 (Pt 3*, 345–56. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9057087

Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., & Vale, W. W. (1993). Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(19), 8967–71. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=47482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Chen, X., Whitney, E. M., Gao, S. Y., & Yang, V. W. (2003). Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *Journal of Molecular Biology*, *326*(3), 665–77. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2693487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Chen, Y. T., Stewart, D. B., & Nelson, W. J. (1999). Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *The Journal of Cell Biology*, *144*(4), 687–99.

Cheng, H., & 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. *The American Journal of Anatomy*, *141*(4), 537–61. doi:10.1002/aja.1001410407

Cheng, K., Samimi, R., Xie, G., Shant, J., Drachenberg, C., Wade, M., … Raufman, J.-P. (2008). Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(3), G591–7. doi:10.1152/ajpgi.00055.2008

Cheng, K., Xie, G., & Raufman, J.-P. (2007). Matrix metalloproteinase-7-catalyzed release of HB-EGF mediates deoxycholyltaurine-induced proliferation of a human colon cancer cell line. *Biochemical Pharmacology*, *73*(7), 1001–12. doi:10.1016/j.bcp.2006.11.028

Cheng, K., Zimniak, P., Raufman, J., Proliferation, A., Human, H., & Cancer, C. (2003). Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Cholinergic Agonist-Induced Proliferation of H508 Human Colon Cancer Cells Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Cholinergic, 6744–6750.

Cheung, L. W. T., Leung, P. C. K., & Wong, A. S. T. (2010). Cadherin switching and activation of p120 catenin signaling are mediators of gonadotropin-releasing hormone to promote tumor cell migration and invasion in ovarian cancer. *Oncogene*, *29*(16), 2427–40. doi:10.1038/onc.2009.523

Chien, Y.-H., Jiang, N., Li, F., Zhang, F., Zhu, C., & Leckband, D. (2008). Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(4), 1848–1856. doi:10.1074/jbc.M708044200

Chimienti, F., Hogg, R. C., Plantard, L., Lehmann, C., Brakch, N., Fischer, J., … Hohl, D. (2003). Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Human Molecular Genetics*, *12*(22), 3017–24. doi:10.1093/hmg/ddg320

Chitaev, N. a, Averbakh, a Z., Troyanovsky, R. B., & Troyanovsky, S. M. (1998). Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex. *Journal of Cell Science*, *111 (Pt 1*, 1941–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645942

Choi, B. J., Cho, Y. G., Song, J. W., Kim, C. J., Kim, S. Y., Nam, S. W., … Park, W. S. (2006). Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathology, Research and Practice*, *202*(8), 585–9. doi:10.1016/j.prp.2006.05.001

Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, *332*(20), 1351–62. doi:10.1056/NEJM199505183322008

Cifuentes-Diaz, C., Nicolet, M., Goudou, D., Rieger, F., & Mege, R. M. (1994). N-cadherin expression in developing, adult and denervated chicken neuromuscular system: accumulations at both the neuromuscular junction and the node of Ranvier. *Development (Cambridge, England)*, *120*(1), 1–11.

Clarke, A. S., Lotz, M. M., Chao, C., & Mercurio, A. M. (1995). Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta 4 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(39), 22673–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559386

Clayburgh, D. R., Shen, L., & Turner, J. R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *84*(3), 282–91. doi:10.1038/labinvest.3700050

Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192–205. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012

Collins, S. M. (2001). Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *280*(3), G315–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171612

Cook, R. D., & Burnstock, G. (1976). The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *Journal of Neurocytology*, *5*(2), 195–206. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1271086

Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *18*(3), 481–96. doi:10.1016/j.bpg.2003.12.003

Crosnier, C., Stamataki, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, *7*(5), 349–59. doi:10.1038/nrg1840

Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., & Rampal, P. (2000). Saccharomyces boulardii preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic Escherichia coli-infected T84 cells. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5998–6004. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101564&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics -- Saccharomyces boulardii. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *26*(6), 767–78. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x

Dajas-Bailador, & Wonnacott. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, *25*(6), 317–324. doi:10.1016/j.tips.2004.04.006

Dang, D. T., Bachman, K. E., Mahatan, C. S., Dang, L. H., Giardiello, F. M., & Yang, V. W. (2000). Decreased expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *FEBS Letters*, *476*(3), 203–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Dang, D. T., Mahatan, C. S., Dang, L. H., Agboola, I. A., & Yang, V. W. (2001). Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene*, *20*(35), 4884–90. doi:10.1038/sj.onc.1204645

Daniel, C., Sartory, N. A., Zahn, N., Radeke, H. H., & Stein, J. M. (2008). Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(1), 23–33. doi:10.1124/jpet.107.127209

Daniel, J. M. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(1), 59–68. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.052

Daniel, J. M., & Reynolds, A. B. (1995). The Tyrosine Kinase Substrate p120 cas Binds Directly to E-Cadherin but Not to the Adenomatous Polyposis Coli Protein or ␣ -Catenin, *15*(9), 4819–4824.

Daniel, J. M., & Reynolds, A. B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(5), 3614–23.

Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., & Baig, A. (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Research*, *30*(13), 2911–9.

Dautzenberg, F. M., & Hauger, R. L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(2), 71–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830263

Dautzenberg, F. M., Higelin, J., Wille, S., & Brauns, O. (2004). Molecular cloning and functional expression of the mouse CRF2(a) receptor splice variant. *Regulatory Peptides*, *121*(1-3), 89–97. doi:10.1016/j.regpep.2004.04.009

De Beco, S., Amblard, F., & Coscoy, S. (2012). New insights into the regulation of E-cadherin distribution by endocytosis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *295*, 63–108. doi:10.1016/B978-0-12-394306-4.00008-3

De Castella, H. (1982). Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, *284*(6330), 1706. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1498567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

De Groot, J., & Harris, G. W. (1950). Hypothalmic control of the anterior pituitary gland and blood lymphocytes. *The Journal of Physiology*, *111*(3-4), 335–46. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1392824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

De Sarno, P., Shestopal, S. A., Zmijewska, A. A., & Jope, R. S. (2005). Anti-apoptotic effects of muscarinic receptor activation are mediated by Rho kinase. *Brain Research*, *1041*(1), 112–5. doi:10.1016/j.brainres.2005.01.081

Delva, E., & Kowalczyk, A. P. (2009). Regulation of cadherin trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(3), 259–67. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00862.x

Demaude, J., Levêque, M., Chaumaz, G., Eutamène, H., Fioramonti, J., Bueno, L., & Ferrier, L. (2009). Acute stress increases colonic paracellular permeability in mice through a mast cell-independent mechanism: involvement of pancreatic trypsin. *Life Sciences*, *84*(23-24), 847–52. doi:10.1016/j.lfs.2009.03.016

Deplancke, B., Finster, K., Graham, W. V., Collier, C. T., Thurmond, J. E., & Gaskins, H. R. (2003). Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *228*(4), 424–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671187

Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(10), 722–37. doi:10.1038/nri3532

Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, *29*(2), 117–29. doi:10.1038/ng1001-117

Díaz, I., & Smani, T. (2013). New insights into the mechanisms underlying vascular and cardiac effects of urocortin. *Current Vascular Pharmacology*, *11*(4), 457–64. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23905640

Donaldson, N. S., Pierre, C. C., Anstey, M. I., Robinson, S. C., Weerawardane, S. M., & Daniel, J. M. (2012). Kaiso represses the cell cycle gene cyclin D1 via sequence-specific and methyl-CpG-dependent mechanisms. *PloS One*, *7*(11), e50398. doi:10.1371/journal.pone.0050398

Donato, R., Wood, S. A., Saunders, I., Gundsambuu, B., Yan Mak, K., Abbott, C. A., & Powell, B. C. (2009). Regulation of epithelial apical junctions and barrier function by Galpha13. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1793*(7), 1228–35. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.04.008

Dorudi, S., Sheffield, J. P., Poulsom, R., Northover, J. M., & Hart, I. R. (1993). E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *The American Journal of Pathology*, *142*(4), 981–6.

Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, *123*(5), 903–915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021

Ducarouge, B., Pelissier-Rota, M., Lainé, M., Cristina, N., Vachez, Y., Scoazec, J.-Y., … Jacquier-Sarlin, M. (2013). CRF2 signaling is a novel regulator of cellular adhesion and migration in colorectal cancer cells. *PloS One*, *8*(11), e79335. doi:10.1371/journal.pone.0079335

Ducarouge, & Jacquier-sarlin, M. (2011). Stress neuromediators are key regulators of the intestinal barrier: Link to inflammation and cancer. *Trends in Cell Molecular Biology*. Retrieved September 26, 2014, from http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/79/35/06/PDF/Ducarouge_Stress_2011_AA.pdf

Duclos, B., Dupas, J. L., Galmiche, J. P., Gendre, J. P., Golfain, D., Gra, C., … Nun, G. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn ' s disease, *411*(May), 603–606.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell and Tissue Research*, *339*(1), 259–68. doi:10.1007/s00441-009-0838-2

Dydensborg, A. B., Herring, E., Tremblay, E., Beaulieu, J., & Bondo, A. (2006). Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon, *4*, 1067–1074. doi:10.1152/ajpgi.00234.2005.

Edelblum, K. L., & Turner, J. R. (2009). The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Current Opinion in Pharmacology*, *9*(6), 715–20. doi:10.1016/j.coph.2009.06.022

Elphick, D. A., & Mahida, Y. R. (2005). Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, *54*(12), 1802–9. doi:10.1136/gut.2005.068601

Elzagheid, A., Algars, A., Bendardaf, R., Lamlum, H., Ristamaki, R., Collan, Y., … Pyrhonen, S. (2006). E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *12*(27), 4304–9.

Emami, M. H., Gholamrezaei, A., & Daneshgar, H. (2009). Hypnotherapy as an adjuvant for the management of inflammatory bowel disease: a case report. *The American Journal of Clinical Hypnosis*, *51*(3), 255–62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19216210

Eppert, K., Scherer, S. W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., … Attisano, L. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, *86*(4), 543–52. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752209

Etienne-Manneville, S. (2014). Neighborly relations during collective migration. *Current Opinion in Cell Biology*, *30C*, 51–59. doi:10.1016/j.ceb.2014.06.004

Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, *420*(6916), 629–35. doi:10.1038/nature01148

Faghih, R., Gopalakrishnan, M., & Briggs, C. A. (2008). Allosteric modulators of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(4), 701–12. doi:10.1021/jm070256g

Fardini, Y., Wang, X., Témoin, S., Nithianantham, S., Lee, D., Shoham, M., & Han, Y. W. (2011). Fusobacterium nucleatum adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. *Molecular Microbiology*, *82*(6), 1468–80. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x

Ferri, G. L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P. J., & Polak, J. M. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, *297*(5865), 409–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7043279

Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., & Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(21), 7551–9. doi:10.1128/MCB.01034-07

Finnemann, S., Mitrik, I., Hess, M., Otto, G., & Wedlich, D. (1997). Uncoupling of XB/U-cadherin-catenin complex formation from its function in cell-cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(18), 11856–62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115244

Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, *115*(1), 182–205. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649475

Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, *59*(1), 221–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/327080

Fontao, L., Stutzmann, J., Gendry, P., & Launay, J. F. (1999). Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research*, *250*(2), 298–312. doi:10.1006/excr.1999.4549

Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(1), 55–70. doi:10.1007/s00418-008-0424-9

Foty, R. A., & Steinberg, M. S. (2005). The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Developmental Biology*, *278*(1), 255–63. doi:10.1016/j.ydbio.2004.11.012

Franz, C. M., & Ridley, A. J. (2004). p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(8), 6588–94. doi:10.1074/jbc.M312812200

Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(7), 445–57. doi:10.1038/nrm2720

Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *124*(4), 619–26. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2119917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R. S., & Kaser, A. (2011). Crohn ' s disease : NOD2 , autophagy and ER stress converge. doi:10.1136/gut.2009.206466

Frucht, H., Jensen, R. T., Dexter, D., & Yang, W. (1999). Human Colon Cancer Cell Proliferation Mediated by the M 3 Muscarinic Cholinergic Receptor Human Colon Cancer Cell Proliferation Mediated by the M 3 Muscarinic Cholinergic Receptor 1, 2532–2539.

Fujii, T., Watanabe, Y., Fujimoto, K., & Kawashima, K. (2007). Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulation of an independent lymphocytic cholinergic activity by immunological stimulation. *Biogenic Amines*, *17*(4-6), 373–386. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15127596

Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., … Sawada, N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *54*(8), 933–44. doi:10.1369/jhc.6A6944.2006

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., … Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, *4*(3), 222–31. doi:10.1038/ncb758

Fukata, M., & Abreu, M. T. (2008). Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*, *27*(2), 234–43. doi:10.1038/sj.onc.1210908

Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., … Abreu, M. T. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, *133*(6), 1869–81. doi:10.1053/j.gastro.2007.09.008

Funakoshi, T., Yamashita, K., Ichikawa, N., Fukai, M., Suzuki, T., Goto, R., … Todo, S. (2012). A novel NF-κB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *Journal of Crohn's & Colitis*, *6*(2), 215–25. doi:10.1016/j.crohns.2011.08.011

Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *81*(1-3), 87–96. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869706

Furness, J. B., Clerc, N., Lomax, A. E., Bornstein, J. C., & Kunze, W. A. (2000). Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research*, *300*(3), 383–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928268

Furness, J. B., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Clerc, N., & Bornstein, J. C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in Neurobiology*, *54*(1), 1–18. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9460790

Galitovskiy, V., Chernyavsky, A. I., Edwards, R. A., & Grando, S. A. (2012). Muscle sarcomas and alopecia in A/J mice chronically treated with nicotine. *Life Sciences*, *91*(21-22), 1109–12. doi:10.1016/j.lfs.2012.03.041

Garabedian, E. M., Roberts, L. J., McNevin, M. S., & Gordon, J. I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(38), 23729–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295317

García-Mauriño, S., Alcaide, A., & Domínguez, C. (2012). Pharmacological control of autophagy: therapeutic perspectives in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(26), 3853–73. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632751

Gareau, M. G., Silva, M. A., & Perdue, M. H. (2008). Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Current Molecular Medicine*, *8*(4), 274–81. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537635

Garrod, D. R., Merritt, A. J., & Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, *14*(5), 537–45. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231347

Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermüller, N., … Autschbach, F. (2001). Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *281*(1), G216–28. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408275

Gayet, J., Zhou, X. P., Duval, A., Rolland, S., Hoang, J. M., Cottu, P., & Hamelin, R. (2001). Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*, *20*(36), 5025–32. doi:10.1038/sj.onc.1204611

Ghia, J. E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E. F., & Collins, S. M. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, *131*(4), 1122–30. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.016

Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2000). Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *14*(12), 1749–53. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973924

Glas, J., Wagner, J., Seiderer, J., Olszak, T., Wetzke, M., Beigel, F., … Brand, S. (2012). PTPN2 gene variants are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis supporting a common genetic disease background. *PloS One*, *7*(3), e33682. doi:10.1371/journal.pone.0033682

Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E. M., Schäffer, A. A., Noyan, F., … Klein, C. (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England Journal of Medicine*, *361*(21), 2033–45. doi:10.1056/NEJMoa0907206

Gong, J., Ko, T. C., & Brattain, M. G. (1998). Disruption of fibronectin binding to the alpha 5 beta 1 integrin stimulates the expression of cyclin-dependent kinases and DNA synthesis through activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(3), 1662–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430710

Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, *74*(6), 363–96. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006

Gout, P., Jacquier-sarlin, M. R., Rouard-talbot, L., Rousselle, P., & Block, M. R. (2001). grins Is Induced by Laminin-5 during Early Stage of HT-29 Cell Differentiation, *12*(October), 3268–3281.

Gout, S., Marie, C., Lainé, M., Tavernier, G., Block, M. R., & Jacquier-Sarlin, M. (2004). Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Experimental Cell Research*, *299*(2), 498–510. doi:10.1016/j.yexcr.2004.06.008

Grace, C. R. R., Perrin, M. H., Cantle, J. P., Vale, W. W., Rivier, J. E., & Riek, R. (2007). Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(51), 16102–14. doi:10.1021/ja0760933

Grady, W. M., Myeroff, L. L., Swinler, S. E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J. D., … Markowitz, S. (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Research*, *59*(2), 320–4. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927040

Grammatopoulos, D. K., & Chrousos, G. P. (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *13*(10), 436–44. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431840

Grando, S. A. (2003). Mucocutaneous cholinergic system is targeted in mustard-induced vesication. *Life Sciences*, *72*(18-19), 2135–44. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628470

Grando, S. A. (2008). Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine:
Biological and Clinical Significance of Non-canonical Ligands of Epithelial Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Pharmacological Sciences*, *106*(2), 174–179. doi:10.1254/jphs.FM0070087

Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, *30*(3), 377–86. doi:10.1093/carcin/bgp014

Grigoriadis, D. E., & De Souza, E. B. (1989). Heterogeneity between brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors is due to differential glycosylation. *Endocrinology*, *125*(4), 1877–88. doi:10.1210/endo-125-4-1877

Grimoud, J., Durand, H., de Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(1), 42–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.007

Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., & Bershadsky, A. D. (2001a). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 4), 695–707. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171375

Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., & Bershadsky, A. D. (2001b). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 4), 695–707.

Groulx, J., Khalfaoui, T., Benoit, Y. D., Bernatchez, G., & Carrier, J. C. (2012). Autophagy is active in normal colon mucosa, (June), 893–902.

Groves, D. A., & Brown, V. J. (2005). Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(3), 493–500. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.01.004

Guarini, S., Altavilla, D., Cainazzo, M.-M., Giuliani, D., Bigiani, A., Marini, H., … Squadrito, F. (2003). Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation*, *107*(8), 1189–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615800

Guillemin, R., & Rosenberg, B. (1955). Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology*, *57*(5), 599–607. doi:10.1210/endo-57-5-599

Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *The Journal of Cell Biology*, *148*(3), 399–404. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174801&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(10), 816–26. doi:10.1038/nrm1490

Gupta, A. K., & Schoen, R. E. (2009). Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Current Opinion in Gastroenterology*, *25*(1), 59–65. doi:10.1097/MOG.0b013e32831db286

Guslandi, M., Giollo, P., & Testoni, P. A. (2003). A pilot trial of Saccharomyces boulardii in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *15*(6), 697–8. doi:10.1097/01.meg.0000059138.68845.06

Gutknecht, E., Vauquelin, G., & Dautzenberg, F. M. (2010). Corticotropin-releasing factor receptors induce calcium mobilization through cross-talk with Gq-coupled receptors. *European Journal of Pharmacology*, *642*(1-3), 1–9. doi:10.1016/j.ejphar.2010.05.027

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5350), 509–14. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438836

Hamzaoui, A., Brahim, M. B., Zhioua, A., Ayed, K., & Hamzaoui, K. (2000). Inflammatory response in induced sputum mononuclear cells from patients with acute exacerbation of asthma. *Mediators of Inflammation*, *9*(3-4), 147–53. doi:10.1080/09629350020002886

Han, Y. W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H. I., Zhou, Y., Li, M., … Deng, C. X. (2005). Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5330–40. doi:10.1128/JB.187.15.5330-5340.2005

Hao, Z., Huang, Y., Cleman, J., Jovin, I. S., Vale, W. W., Bale, T. L., & Giordano, F. J. (2008). Urocortin2 inhibits tumor growth via effects on vascularization and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(10), 3939–44. doi:10.1073/pnas.0712366105

Harrison, O. J., Corps, E. M., & Kilshaw, P. J. (2005). Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *Journal of Cell Science*, *118*(Pt 18), 4123–30. doi:10.1242/jcs.02539

Harrison, O. J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., … Honig, B. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure (London, England : 1993)*, *19*(2), 244–56. doi:10.1016/j.str.2010.11.016

Hartnett, L., & Egan, L. J. (2012). Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*, *33*(4), 723–31. doi:10.1093/carcin/bgs006

Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2012). Competitive regulation of E-cadherin juxtamembrane domain degradation by p120-catenin binding and Hakai-mediated ubiquitination. *PloS One*, *7*(5), e37476. doi:10.1371/journal.pone.0037476

Hatzfeld, M. (1999). The armadillo family of structural proteins. *International Review of Cytology*, *186*, 179–224.

Hauger, R. L., Grigoriadis, D. E., Dallman, M. F., Plotsky, P. M., Vale, W. W., & Dautzenberg, F. M. (2003). International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacological Reviews*, *55*(1), 21–6. doi:10.1124/pr.55.1.3

Hauri, H. P., Roth, J., Sterchi, E. E., & Lentze, M. J. (1985). Transport to cell surface of intestinal sucrase-isomaltase is blocked in the Golgi apparatus in a patient with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(13), 4423–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=391113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Häussinger, D., Ahrens, T., Sass, H.-J., Pertz, O., Engel, J., & Grzesiek, S. (2002). Calcium-dependent Homoassociation of E-cadherin by NMR Spectroscopy: Changes in Mobility, Conformation and Mapping of Contact Regions. *Journal of Molecular Biology*, *324*(4), 823–839. doi:10.1016/S0022-2836(02)01137-3

Hawcroft, G., Ko, C. W. S., & Hull, M. A. (2007). Prostaglandin E2-EP4 receptor signalling promotes tumorigenic behaviour of HT-29 human colorectal cancer cells. *Oncogene*, *26*(21), 3006–19. doi:10.1038/sj.onc.1210113

Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of Cell Biology*, *148*(4), 779–90.

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., … Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5382), 1509–12.

Hebb, C. O. (1954). Acetylcholine metabolism of nervous tissue. *Pharmacological Reviews*, *6*(1), 39–43. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13155144

Hebb, C. O., & Whittaker, V. P. (1958). Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *The Journal of Physiology*, *142*(1), 187–96. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1356703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., … Cooke, J. P. (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature Medicine*, *7*(7), 833–9. doi:10.1038/89961

Heidmann, T., Bernhardt, J., Neumann, E., & Changeux, J. P. (1983). Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from Torpedo marmorata. *Biochemistry*, *22*(23), 5452–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6652072

Heidmann, T., & Changeux, J. P. (1980). Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata in the millisecond time range: resolution of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *97*(3), 889–96. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7470156

Heitkemper, M. M., Cain, K. C., Burr, R. L., Jun, S.-E., & Jarrett, M. E. (2011). Is childhood abuse or neglect associated with symptom reports and physiological measures in women with irritable bowel syndrome? *Biological Research for Nursing*, *13*(4), 399–408. doi:10.1177/1099800410393274

Hermiston, M. L., & Gordon, J. I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science (New York, N.Y.)*, *270*(5239), 1203–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7502046

Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, *27*(3), 260–86. doi:10.1210/er.2005-0034

Hinnebusch, B. F., Siddique, A., Henderson, J. W., Malo, M. S., Zhang, W., Athaide, C. P., … Hodin, R. A. (2004). Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *286*(1), G23–30. doi:10.1152/ajpgi.00203.2003

Hintermann, E., Yang, N., O'Sullivan, D., Higgins, J. M. G., & Quaranta, V. (2005). Integrin alpha6beta4-erbB2 complex inhibits haptotaxis by up-regulating E-cadherin cell-cell junctions in keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(9), 8004–15. doi:10.1074/jbc.M406301200

Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., & Takeichi, M. (1992). Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*, *70*(2), 293–301. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638632

Hirohashi, S., & Kanai, Y. (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Science*, *94*(7), 575–81. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841864

Hirota, C. L., & McKay, D. M. (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology*, *149*(5), 463–79. doi:10.1038/sj.bjp.0706889

Ho, Y.-C., & Chang, Y.-C. (2006). Regulation of nicotine-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human gingival fibroblasts. *Acta Pharmacologica Sinica*, *27*(4), 409–13. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00286.x

Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*, *5*(10), 971–4. doi:10.1038/ni1004-971

Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C. W. H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., & Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *The Journal of Comparative Neurology*, *509*(4), 356–71. doi:10.1002/cne.21769

Hong, J. Y., Park, J.-I., Cho, K., Gu, D., Ji, H., Artandi, S. E., & McCrea, P. D. (2010). Shared molecular mechanisms regulate multiple catenin proteins: canonical Wnt signals and components modulate p120-catenin isoform-1 and additional p120 subfamily members. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 24), 4351–65. doi:10.1242/jcs.067199

Hong, S., Troyanovsky, R. B., & Troyanovsky, S. M. (2010). Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3528–33. doi:10.1073/pnas.0911027107

Horikawa, K., Radice, G., Takeichi, M., & Chisaka, O. (1999). Adhesive subdivisions intrinsic to the epithelial somites. *Developmental Biology*, *215*(2), 182–9. doi:10.1006/dbio.1999.9463

Hosking, C. R., Ulloa, F., Hogan, C., Ferber, E. C., Figueroa, A., Gevaert, K., … Fujita, Y. (2007). The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(5), 1918–27. doi:10.1091/mbc.E06-10-0941

Hotz, H. G., Hotz, B., & Buhr, H.-J. (2011). Genes associated with epithelial-mesenchymal transition: possible therapeutic targets in ductal pancreatic adenocarcinoma? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *11*(5), 448–54. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492078

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., & Rivard, N. (2001). Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 21885–94. doi:10.1074/jbc.M100236200

Howe, J. R., Bair, J. L., Sayed, M. G., Anderson, M. E., Mitros, F. A., Petersen, G. M., … Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nature Genetics*, *28*(2), 184–7. doi:10.1038/88919

Hsu, S. Y. T. (2004). Bioinformatics in reproductive biology--functional annotation based on comparative sequence analysis. *Journal of Reproductive Immunology*, *63*(1), 75–83. doi:10.1016/j.jri.2004.01.008

Huang, M., Kempuraj, D., Papadopoulou, N., Kourelis, T., Donelan, J., Manola, A., & Theoharides, T. C. (2009). Urocortin induces interleukin-6 release from rat cardiomyocytes through p38 MAP kinase, ERK and NF-kappaB activation. *Journal of Molecular Endocrinology*, *42*(5), 397–405. doi:10.1677/JME-08-0120

Hubbard, V. M., Valdor, R., Macian, F., & Cuervo, A. M. (2012). Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. *Biogerontology*, *13*(1), 21–35. doi:10.1007/s10522-011-9331-x

Huber, a H., & Weis, W. I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, *105*(3), 391–402. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348595

Huber, A. H., Weis, W. I., & West, C. D. (2001). The Structure of the -Catenin / E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by -Catenin, *105*, 391–402.

Hulpiau, P., & van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(2), 349–69. doi:10.1016/j.biocel.2008.09.027

Ichii, T., & Takeichi, M. (2007). p120-catenin regulates microtubule dynamics and cell migration in a cadherin-independent manner. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *12*(7), 827–39. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01095.x

Im, E., Rhee, S. H., Park, Y. S., Fiocchi, C., Taché, Y., & Pothoulakis, C. (2010). Corticotropin-releasing hormone family of peptides regulates intestinal angiogenesis. *Gastroenterology*, *138*(7), 2457–67, 2467.e1–5. doi:10.1053/j.gastro.2010.02.055

Imaki, T., Katsumata, H., Miyata, M., Naruse, M., Imaki, J., & Minami, S. (2001). Expression of corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in paraventricular nucleus after acute stress. *Neuroendocrinology*, *73*(5), 293–301. doi:54646

Ireton, R. C., Davis, M. a, van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. a, … Reynolds, A. B. (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of Cell Biology*, *159*(3), 465–76. doi:10.1083/jcb.200205115

Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A., & Philpott, D. J. (2014). The Multifaceted Role of the Intestinal Microbiota in Colon Cancer. *Molecular Cell*, *54*(2), 309–320. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.039

Ishiyama, N., Lee, S.-H., Liu, S., Li, G.-Y., Smith, M. J., Reichardt, L. F., & Ikura, M. (2010). Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell*, *141*(1), 117–128. doi:10.1016/j.cell.2010.01.017

Iwao, K., Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Kinoshita, M., Fukui, T., … Miyoshi, Y. (1998). Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Research*, *58*(5), 1021–6.

Jahn, H. U., Ullrich, R., Schneider, T., Liehr, R. M., Schieferdecker, H. L., Holst, H., & Zeitz, M. (1996). Immunological and trophical effects of Saccharomyces boulardii on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion*, *57*(2), 95–104. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786007

Jamora, C., & Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, *4*(4), E101–8. doi:10.1038/ncb0402-e101

Jankowski, J. A., Bedford, F. K., & Kim, Y. S. (1997). Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, *57*, 187–215. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175434

Jessen, K. R., & Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *3*(11), 2206–18. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138397

Jiang, G., Wang, Y., Dai, S., Liu, Y., Stoecker, M., Wang, E., & Wang, E. (2012). P120-catenin isoforms 1 and 3 regulate proliferation and cell cycle of lung cancer cells via β-catenin and Kaiso respectively. *PloS One*, *7*(1), e30303. doi:10.1371/journal.pone.0030303

Jin, L., Zhang, Q., Guo, R., Wang, L., Wang, J., Wan, R., … Li, S. (2011). Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *Journal of Molecular Endocrinology*, *47*(2), 219–27. doi:10.1530/JME-11-0048

Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, *7*(3), 279–296. doi:10.4161/auto.7.3.14487

Jones, R. G., Li, X., Gray, P. D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W. S., … Kuwada, S. K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *The Journal of Cell Biology*, *175*(3), 505–14. doi:10.1083/jcb.200602160

Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(6), 3463–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148087

Justice, N. J., Yuan, Z. F., Sawchenko, P. E., & Vale, W. (2008). Type 1 corticotropin-releasing factor receptor expression reported in BAC transgenic mice: implications for reconciling ligand-receptor mismatch in the central corticotropin-releasing factor system. *The Journal of Comparative Neurology*, *511*(4), 479–96. doi:10.1002/cne.21848

Kanai, M., Wei, D., Li, Q., Jia, Z., Ajani, J., Le, X., … Xie, K. (2006). Loss of Krüppel-like factor 4 expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(21), 6395–402. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1034

Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., & Chatzaki, E. (2010). The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *67*(8), 1293–306. doi:10.1007/s00018-010-0265-2

Karakiulakis, G., & Roth, M. (2012). Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: anti-inflammatory and antiremodeling effects. *Mediators of Inflammation*, *2012*, 409580. doi:10.1155/2012/409580

Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Efstathiou, J., Valizadeh, A., Noda, M., Playford, R. J., … Pignatelli, M. (1998). Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *The Journal of Pathology*, *185*(4), 413–8. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199808)185:4<413::AID-PATH125>3.0.CO;2-K

Karteris, E., Grammatopoulos, D., Randeva, H., & Hillhouse, E. W. (2000). Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the feto-placental unit. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *85*(5), 1989–96. doi:10.1210/jcem.85.5.6590

Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Actman, L., McNally, S. R., Silberg, D. G., … Kaestner, K. H. (2005). Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology*, *128*(4), 935–45. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825076

Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W., & Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development (Cambridge, England)*, *129*(11), 2619–28. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2225535&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Kawahito, Y., Sano, H., Kawata, M., Yuri, K., Mukai, S., Yamamura, Y., … Kondo, M. (1994). Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. *Gastroenterology*, *106*(4), 859–65. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511553

Kawahito, Y., Sano, H., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Yamamura, Y., … Kondo, M. (1995). Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*, *37*(4), 544–51. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1382908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Kayama, H., Nishimura, J., & Takeda, K. (2013). Regulation of intestinal homeostasis by innate immune cells. *Immune Network*, *13*(6), 227–34. doi:10.4110/in.2013.13.6.227

Kedinger, M., Lefebvre, O., Duluc, I., Freund, J. N., & Simon-Assmann, P. (1998). Cellular and molecular partners involved in gut morphogenesis and differentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *353*(1370), 847–56. doi:10.1098/rstb.1998.0249

Keirsebilck, A., Bonne, S., Staes, K., Hengel, J. Van, Nollet, F., Reynolds, A., & Roy, F. Van. (1998). Molecular Cloning of the Human p120 ctn Catenin Gene (CTNND1): Expression of Multiple Alternatively Spliced Isoforms. *Genomics*, *146*, 129–146.

Khiroug, S. S., Harkness, P. C., Lamb, P. W., Sudweeks, S. N., Khiroug, L., Millar, N. S., & Yakel, J. L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *The Journal of Physiology*, *540*(Pt 2), 425–34. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2290261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Kiliaan, A. J., Saunders, P. R., Bijlsma, P. B., Berin, M. C., Taminiau, J. A., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1998). Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *The American Journal of Physiology*, *275*(5 Pt 1), G1037–44. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815034

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., & Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *462*(2), 245–53. doi:10.1016/j.abb.2007.03.034

Kim, S. W., Park, J.-I., Spring, C. M., Sater, A. K., Ji, H., Otchere, A. A., … McCrea, P. D. (2004). Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nature Cell Biology*, *6*(12), 1212–20. doi:10.1038/ncb1191

Kim, Y., Kugler, M. C., Wei, Y., Kim, K. K., Li, X., Brumwell, A. N., & Chapman, H. A. (2009). Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *The Journal of Cell Biology*, *184*(2), 309–22. doi:10.1083/jcb.200806067

Kimura, T., Amano, T., Uehara, H., Ariga, H., Ishida, T., Torii, A., … Yamato, S. (2007). Urocortin I is present in the enteric nervous system and exerts an excitatory effect via cholinergic and serotonergic pathways in the rat colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *293*(4), G903–10. doi:10.1152/ajpgi.00066.2007

Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S., & Matsuzawa, Y. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*, *90*(1), 75–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10076568

Kojima, M., Wakai, K., Tokudome, S., Tamakoshi, K., Toyoshima, H., Watanabe, Y., … Tamakoshi, A. (2005). Perceived psychologic stress and colorectal cancer mortality: findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *Psychosomatic Medicine*, *67*(1), 72–7. doi:10.1097/01.psy.0000151742.43774.6d

Konishi, S., Kasagi, Y., Katsumata, H., Minami, S., & Imaki, T. (2003). Regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) type-1 receptor gene expression by CRF in the hypothalamus. *Endocrine Journal*, *50*(1), 21–36. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12733706

Kourtidis, A., Ngok, S. P., & Anastasiadis, P. Z. (2013). *P120 Catenin: an Essential Regulator of Cadherin Stability, Adhesion-Induced Signaling, and Cancer Progression. Progress in molecular biology and translational science* (1st ed., Vol. 116, pp. 409–32). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2

Kozicz, T., & Arimura, A. (2002). Distribution of urocortin in the rat's gastrointestinal tract and its colocalization with tyrosine hydroxylase. *Peptides*, *23*(3), 515–21. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836001

Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2008). Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PloS One*, *3*(10), e3391. doi:10.1371/journal.pone.0003391

Kuo, W.-L., Lee, L.-Y., Wu, C.-M., Wang, C.-C., Yu, J.-S., Liang, Y., … Hwang, T.-L. (2006). Differential expression of claudin-4 between intestinal and diffuse-type gastric cancer. *Oncology Reports*, *16*(4), 729–34. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969486

Lacy, E. R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *10 Suppl 1*, S72–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053884

Laprise, P., Chailler, P., Houde, M., Beaulieu, J.-F., Boucher, M.-J., & Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(10), 8226–34. doi:10.1074/jbc.M110235200

Larauche, M., Gourcerol, G., Wang, L., Pambukchian, K., Brunnhuber, S., Adelson, D. W., … Taché, Y. (2009). Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *297*(1), G215–27. doi:10.1152/ajpgi.00072.2009

Larsen, S., Bendtzen, K., & Nielsen, O. H. (2010). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. *Annals of Medicine*, *42*(2), 97–114. doi:10.3109/07853890903559724

Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., & Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(17), 8263–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbin, B. A., … Parkos, C. A. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(13), 3067–76. doi:10.1084/jem.20071416

Lee, S. K., Kim, Y. W., Chi, S.-G., Joo, Y.-S., & Kim, H. J. (2009). The effect of Saccharomyces boulardii on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *54*(2), 255–63. doi:10.1007/s10620-008-0357-0

Leivo, I., Tani, T., Laitinen, L., Bruns, R., Kivilaakso, E., Lehto, V. P., … Virtanen, I. (1996). Anchoring complex components laminin-5 and type VII collagen in intestine: association with migrating and differentiating enterocytes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *44*(11), 1267–77.

Lenaerts, K., Bouwman, F. G., Lamers, W. H., Renes, J., & Mariman, E. C. (2007). Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics*, *8*, 91. doi:10.1186/1471-2164-8-91

Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., & Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(9), 3739–43. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research*, *50*(19), 6334–43. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205381

Lesuffleur, T., Kornowski, A., Luccioni, C., Muleris, M., Barbat, A., Beaumatin, J., … Zweibaum, A. (1991). Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *49*(5), 721–30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937958

Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., & Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*, *7*(3), 182–9. doi:10.1038/cmi.2010.22

Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., … Vale, W. W. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(13), 7570–5. doi:10.1073/pnas.121165198

Li, C., Chen, P., Vaughan, J., Blount, A., Chen, A., Jamieson, P. M., … Vale, W. (2003). Urocortin III is expressed in pancreatic beta-cells and stimulates insulin and glucagon secretion. *Endocrinology*, *144*(7), 3216–24. doi:10.1210/en.2002-0087

Li, Q., Zhang, Q., Zhang, M., Wang, C., Zhu, Z., Li, N., & Li, J. (2008). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on membrane microdomain localization of tight junction proteins in experimental colitis. *The FEBS Journal*, *275*(3), 411–20. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06210.x

Li, Y., de Haar, C., Chen, M., Deuring, J., Gerrits, M. M., Smits, R., … van der Woude, C. J. (2010). Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut*, *59*(2), 227–35. doi:10.1136/gut.2009.184176

Liapakis, G., Venihaki, M., Margioris, A., Grigoriadis, D., & Gkountelias, K. (2011). Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Current Medicinal Chemistry*, *18*(17), 2583–600. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21568890

Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., & Xu, G. (2002). Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *224*(1), 18–29. doi:10.1002/dvdy.10087

Lin, Q., Wang, F., Yang, R., Zheng, X., Gao, H., & Zhang, P. (2013). Effect of chronic restraint stress on human colorectal carcinoma growth in mice. *PloS One*, *8*(4), e61435. doi:10.1371/journal.pone.0061435

Lindenboim, L., Pinkas-Kramarski, R., Sokolovsky, M., & Stein, R. (1995). Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *Journal of Neurochemistry*, *64*(6), 2491–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7760028

Liu, S., Gao, N., Hu, H.-Z., Wang, X., Wang, G.-D., Fang, X., … Wood, J. D. (2006). Distribution and chemical coding of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the guinea pig enteric nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *494*(1), 63–74. doi:10.1002/cne.20781

Lohi, J., Leivo, I., Tani, T., Kiviluoto, T., Kivilaakso, E., Burgeson, R. E., & Virtanen, I. (1996). Laminins, tenascin and type VII collagen in colorectal mucosa. *The Histochemical Journal*, *28*(6), 431–40.

Lovejoy, D. A., & de Lannoy, L. (2013). Evolution and phylogeny of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides: expansion and specialization in the vertebrates. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *54*, 50–6. doi:10.1016/j.jchemneu.2013.09.006

Lovenberg, T. W., Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Clevenger, W., Chalmers, D. T., De Souza, E. B., & Oltersdorf, T. (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(3), 836–40. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Machado, J. C., Soares, P., Carneiro, F., Rocha, A., Beck, S., Blin, N., … Sobrinho-Simões, M. (1999). E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *79*(4), 459–65.

Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T., & Gumucio, D. L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development (Cambridge, England)*, *132*(2), 279–89. doi:10.1242/dev.01576

Madsen, K. L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J. S., Jewell, L. D., & Fedorak, R. N. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflammatory Bowel Diseases*, *5*(4), 262–70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10579119

Mammen, J. M. V, & Matthews, J. B. (2003). Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Critical Care Medicine*, *31*(8 Suppl), S532–7. doi:10.1097/01.CCM.0000081429.89277.AF

Maneckjee, R., & Minna, J. D. (1990). Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(9), 3294–8. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Maneckjee, R., & Minna, J. D. (1994). Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, *5*(10), 1033–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7848904

Manenti, G., Gariboldi, M., Fiorino, A., Zanesi, N., Pierotti, M. A., & Dragani, T. A. (1997). Genetic Mapping of Lung Cancer Modifier Loci Specifically Affecting Tumor Initiation and Progression. *Cancer Research* , *57* (19), 4164–4166. Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/19/4164.abstract

Mangan, J. K., Tantravahi, R. V, Rane, S. G., & Reddy, E. P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor-induced upregulation of Jak3 transcription during granulocytic differentiation is mediated by the cooperative action of Sp1 and Stat3. *Oncogene*, *25*(17), 2489–99. doi:10.1038/sj.onc.1209280

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261–74. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., … Robakis, N. K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO Journal*, *21*(8), 1948–56. doi:10.1093/emboj/21.8.1948

Mariadason, J. M., Velcich, A., Wilson, A. J., Augenlicht, L. H., & Gibson, P. R. (2001). Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology*, *120*(4), 889–99. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231943

Marieb E.N. (2010). *Anatomie et physiologie humaines*. (P. Education, Ed.).

Markovic, D., & Grammatopoulos, D. K. (2010). Characterization of structural determinants of type 1 corticotropin releasing hormone (CRH) receptor signalling properties. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *634*, 285–307. doi:10.1007/978-1-60761-652-8_21

Martinez-Rico, C., Pincet, F., Thiery, J.-P., & Dufour, S. (2010). Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 5), 712–22. doi:10.1242/jcs.047878

Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., … Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, *190*(3), 269–319. doi:10.1007/s00213-006-0441-0

Mauguière, F. (1996). [Intermittent chronic stimulation of the vagus nerve: a last chance for palliative treatment of drug-resistant epileptic seizures?]. *Revue Neurologique*, *152*(4), 231–3. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8763650

Mawdsley, J. E., & Rampton, D. S. (2006). The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation*, *13*(5-6), 327–36. doi:10.1159/000104861

McCusker, C. D., & Alfandari, D. (2009). Life after proteolysis: Exploring the signaling capabilities of classical cadherin cleavage fragments. *Communicative & Integrative Biology*, *2*(2), 155–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2686372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

McGilligan, V. E., Wallace, J. M. W., Heavey, P. M., Ridley, D. L., & Rowland, I. R. (2007). Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *13*(1), 108–15. doi:10.1002/ibd.20020

Meier, J., & Sturm, A. (2011). Current treatment of ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *17*(27), 3204–12. doi:10.3748/wjg.v17.i27.3204

Melgar, S., Engström, K., Jägervall, A., & Martinez, V. (2008). Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *11*(5), 348–62. doi:10.1080/10253890701820166

Meregnani, J., Clarençon, D., Vivier, M., Peinnequin, a, Mouret, C., Sinniger, V., … Bonaz, B. (2011). Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, *160*(1-2), 82–9. doi:10.1016/j.autneu.2010.10.007

Metzen, J., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Kilbinger, H., & Wessler, I. (2003). Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. *Life Sciences*, *72*(18-19), 2075–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628459

Meyer, T. N., Schwesinger, C., & Denker, B. M. (2002). Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(28), 24855–8. doi:10.1074/jbc.C200240200

Miller, G., Chen, E., & Cole, S. W. (2009). Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. *Annual Review of Psychology*, *60*, 501–24. doi:10.1146/annurev.psych.60.110707.163551

Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., … Redston, M. (1999). Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Research*, *59*(14), 3346–51.

Miyashita, Y., & Ozawa, M. (2007). A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 24), 4395–406. doi:10.1242/jcs.03489

Miyata, I., Shiota, C., Chaki, S., Okuyama, S., & Inagami, T. (2001). Localization and characterization of a short isoform of the corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha (CRF(2)alpha-tr) in the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *280*(2), 553–7. doi:10.1006/bbrc.2000.4112

Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, *147*(4), 728–741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026

Mo, Y. Y., & Reynolds, A. B. (1996). Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer Research*, *56*(11), 2633–40.

Mohammad, Y. N., Perone, M., Wang, L., Ingleton, P. M., Castro, M. G., & Lovejoy, D. A. (2002). Expression of prolactin receptors and regulation of cell proliferation by prolactin, corticotropin-releasing factor, and corticosterone in a neuroblastoma cell line. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *80*(4), 475–82. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234101

Mokbel, M., Carbonnel, F., Beaugerie, L., Gendre, J. P., & Cosnes, J. (1998). [Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, *22*(11), 858–62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881267

Moreau, K., Renna, M., & Rubinsztein, D. C. (2013). Connections between SNAREs and autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, *38*(2), 57–63. doi:10.1016/j.tibs.2012.11.004

Moss, A. C., Anton, P., Savidge, T., Newman, P., Cheifetz, A. S., Gay, J., … Pothoulakis, C. (2007). Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha. *Gut*, *56*(9), 1210–7. doi:10.1136/gut.2006.110668

Motley, R. J., Rhodes, J., Ford, G. A., Wilkinson, S. P., Chesner, I. M., Asquith, P., … Mayberry, J. F. (1987). Time relationships between cessation of smoking and onset of ulcerative colitis. *Digestion*, *37*(2), 125–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3622939

Mousa, S., & Mousa, S. A. (2006). Cellular and molecular mechanisms of nicotine's pro-angiogenesis activity and its potential impact on cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *97*(6), 1370–8. doi:10.1002/jcb.20741

Muise, A. M., Walters, T. D., Glowacka, W. K., Griffiths, A. M., Ngan, B.-Y., Lan, H., … Rotin, D. (2009). Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut*, *58*(8), 1121–7. doi:10.1136/gut.2008.175117

Muramatsu, Y., Fukushima, K., Iino, K., Totsune, K., Takahashi, K., Suzuki, T., … Sasano, H. (2000). Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides*, *21*(12), 1799–809. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150640

Murga, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., & Gutkind, J. S. (1998). Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(30), 19080–5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9668091

Murgia, C., Blaikie, P., Kim, N., Dans, M., Petrie, H. T., & Giancotti, F. G. (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *The EMBO Journal*, *17*(14), 3940–51. doi:10.1093/emboj/17.14.3940

Murillo, L. S., Morré, S. A., & Peña, A. S. (2003). Toll-like receptors and NOD/CARD proteins: pattern recognition receptors are key elements in the regulation of immune response. *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998)*, *39*(6), 415–38. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944995

Nelson, W. J., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1483–7. doi:10.1126/science.1094291

Neunlist, Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., … Galmiche, J. P. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *292*(1), G231–41. doi:10.1152/ajpgi.00276.2005

Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., … Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *285*(5), G1028–36. doi:10.1152/ajpgi.00066.2003

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., & Savidge, T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, *263*(6), 577–83. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01963.x

Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *The Journal of Investigative Dermatology*, *127*(11), 2525–32. doi:10.1038/sj.jid.5700865

Nieto, M. A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6159), 1234850. doi:10.1126/science.1234850

Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, *81*(1), 53–62. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7536630

Noguchi, M., Hiwatashi, N., Liu, Z., & Toyota, T. (1998). Secretion imbalance between tumour necrosis factor and its inhibitor in inflammatory bowel disease. *Gut*, *43*(2), 203–9. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1727225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Nollet, F., Kools, P., & van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology*, *299*(3), 551–72. doi:10.1006/jmbi.2000.3777

Noren, N. K., Liu, B. P., Burridge, K., & Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of Cell Biology*, *150*(3), 567–80.

Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Kure, S., Kirkner, G. J., Schernhammer, E. S., … Ogino, S. (2008). Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PloS One*, *3*(11), e3698. doi:10.1371/journal.pone.0003698

Odes, H. S., Fich, A., Reif, S., Halak, A., Lavy, A., Keter, D., … Gilat, T. (2001). Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *46*(8), 1717–21. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508673

Ogasawara, N., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Inada, K., Cao, X., Takenaka, Y., … Tatematsu, M. (2006). Mutations and nuclear accumulation of beta-catenin correlate with intestinal phenotypic expression in human gastric cancer. *Histopathology*, *49*(6), 612–21. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02560.x

Ogawa, H., Fujii, T., Watanabe, Y., & Kawashima, K. (2003). Expression of multiple mRNA species for choline acetyltransferase in human T-lymphocytes. *Life Sciences*, *72*(18-19), 2127–2130. doi:10.1016/S0024-3205(03)00072-9

Ohgaki, H., Hasegawa, H., Kato, T., Suenaga, M., Ubukata, M., Sato, S., … Sugimura, T. (1986). Carcinogenicity in mice and rats of heterocyclic amines in cooked foods. *Environmental Health Perspectives*, *67*, 129–34. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1474407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Oloumi, A., McPhee, T., & Dedhar, S. (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1691*(1), 1–15. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.12.002

Onorati, F., Chen-Scarabelli, C., Knight, R., Stephanou, A., Mohanti, B., Santini, F., … Faggian, G. (2013). Targeting urocortin signaling pathways to enhance cardioprotection: is it time to move from bench to bedside? *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, *27*(5), 451–63. doi:10.1007/s10557-013-6468-7

Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Rousselle, P., Messent, A., Gavrilovic, J., Meneguzzi, G., … Simon-Assmann, P. (1998). Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *Journal of Cell Science*, *111 (Pt 1*, 1993–2004. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645947

Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I., Yau, P., Takeichi, M., & Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5196), 386–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824937

Overman, E. L., Rivier, J. E., & Moeser, A. J. (2012). CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF-α. *PloS One*, *7*(6), e39935. doi:10.1371/journal.pone.0039935

Palacios, F., Tushir, J. S., Fujita, Y., & D'Souza-Schorey, C. (2005). Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(1), 389–402. doi:10.1128/MCB.25.1.389-402.2005

Paleari, L., Catassi, A., Ciarlo, M., Cavalieri, Z., Bruzzo, C., Servent, D., … Russo, P. (2008). Role of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor in human non-small cell lung cancer proliferation. *Cell Proliferation*, *41*(6), 936–59. doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00566.x

Pang, J.-H., Kraemer, A., Stehbens, S. J., Frame, M. C., & Yap, A. S. (2005). Recruitment of phosphoinositide 3-kinase defines a positive contribution of tyrosine kinase signaling to E-cadherin function. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(4), 3043–50. doi:10.1074/jbc.M412148200

Parisini, E., Higgins, J. M. G., Liu, J., Brenner, M. B., & Wang, J. (2007). The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *Journal of Molecular Biology*, *373*(2), 401–411. doi:10.1016/j.jmb.2007.08.011

Park, J., Ji, H., Jun, S., Gu, D., Hikasa, H., Li, L., … McCrea, P. D. (2006). Frodo links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Developmental Cell*, *11*(5), 683–95. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.022

Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, M., Ochani, K., Yang, L.-H., … Pavlov, V. A. (n.d.). Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *14*(9-10), 567–74. doi:10.2119/2008-00079.Parrish

Pavlov, V. a, & Tracey, K. J. (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, *19*(6), 493–9. doi:10.1016/j.bbi.2005.03.015

Pavlov, Wang, H., Czura, C. J., Friedman, S. G., & Tracey, K. J. (2003). The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *9*(5-8), 125–34. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1430829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Pedersen, J., Coskun, M., Soendergaard, C., Salem, M., & Nielsen, O. H. (2014). Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(1), 64–77. doi:10.3748/wjg.v20.i1.64

Peeters. (2001). Diagnostic value of anti-Saccharomyces Inflammatory, and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in bowel disease. *Am J Gastroenterol*, *96*.

Peignon, G., Thenet, S., Schreider, C., Fouquet, S., Ribeiro, A., Dussaulx, E., … Le Beyec, J. (2006). E-cadherin-dependent transcriptional control of apolipoprotein A-IV gene expression in intestinal epithelial cells: a role for the hepatic nuclear factor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(6), 3560–8. doi:10.1074/jbc.M506360200

Pellissier, S., Dantzer, C., Canini, F., Mathieu, N., & Bonaz, B. (2010). Psychological adjustment and autonomic disturbances in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(5), 653–62. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.10.004

Pérez-Navarro, R., Ballester, I., Zarzuelo, A., & Sánchez de Medina, F. (2005). Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. *Life Sciences*, *76*(13), 1489–501. doi:10.1016/j.lfs.2004.09.019

Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., & Gumbiner, B. M. (2007). E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(6), 2013–25. doi:10.1091/mbc.E06-04-0348

Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, C., & M. (2007). IBD serological panels: facts and perspectives. *Bowel Dis Inflamm*, *13*(12).

Piccinni, S. A., Bolcato-Bellemin, A.-L., Klein, A., Yang, V. W., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., & Lefebvre, O. (2004). Kruppel-like factors regulate the Lama1 gene encoding the laminin alpha1 chain. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9103–14. doi:10.1074/jbc.M305804200

Pieters, T., van Hengel, J., & van Roy, F. (2012). Functions of p120ctn in development and disease. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *17*, 760–83.

Pieters, T., & van Roy, F. (2014). Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 12), 2603–13. doi:10.1242/jcs.146720

Pinto, D., & Clevers, H. (2005). Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Experimental Cell Research*, *306*(2), 357–63. doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.022

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & Development*, *17*(14), 1709–13. doi:10.1101/gad.267103

Pinto, Rabine-leon, Appay, Kedinger, & Zweibaum. (1983). Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biol. Cell*. Retrieved October 01, 2014, from http://sodbib.udl.es/gtb/sod/usu/$UDLG/repositorio/20331086_13714210.pdf

Pisarchik, A., & Slominski, A. T. (2001). Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(14), 2754–6. doi:10.1096/fj.01-0487fje

Planchon, S., Fiocchi, C., Takafuji, V., & Roche, J. K. (1999). Transforming growth factor-beta1 preserves epithelial barrier function: identification of receptors, biochemical intermediates, and cytokine antagonists. *Journal of Cellular Physiology*, *181*(1), 55–66. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<55::AID-JCP6>3.0.CO;2-M

Platta, H. W., & Stenmark, H. (2011). Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *23*(4), 393–403. doi:10.1016/j.ceb.2011.03.008

Plummer, H. K., Sheppard, B. J., & Schuller, H. M. (2000). Interaction of tobacco-specific toxicants with nicotinic cholinergic regulation of fetal pulmonary neuroendocrine cells: implications for pediatric lung disease. *Experimental Lung Research*, *26*(2), 121–35. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742926

Podolsky, D. K. (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *The American Journal of Physiology*, *277*(3 Pt 1), G495–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484372

Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., & Engel, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *223*(3), 1019–26. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8055942

Pompolo, S., & Furness, J. B. (1998). Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell and Tissue Research*, *294*(2), 219–26. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799437

Popivanova, B. K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., … Mukaida, N. (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 560–70. doi:10.1172/JCI32453

Pothoulakis, C. (2009). Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of Saccharomyces boulardii. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *30*(8), 826–33. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04102.x

Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., & Leeman, S. E. (1998). Neuroimmune mechanisms of intestinal responses to stress. Role of corticotropin-releasing factor and neurotensin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *840*, 635–48. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629290

Potten, C. S., Hume, W. J., Reid, P., & Cairns, J. (1978). The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, *15*(3), 899–906. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/728994

Potten, C. S., Kovacs, L., & Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell and Tissue Kinetics*, *7*(3), 271–83. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4837676

Prochnow, N., & Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(1), 71–7. doi:10.1007/s00418-008-0434-7

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., … Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development*, *15*(13), 1613–8. doi:10.1101/gad.198501

Pullan, R. D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J. S., Williams, G. T., … Thomas, G. A. (1994). Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *The New England Journal of Medicine*, *330*(12), 811–5. doi:10.1056/NEJM199403243301202

Qiu, B. S., Vallance, B. A., Blennerhassett, P. A., & Collins, S. M. (1999). The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nature Medicine*, *5*(10), 1178–82. doi:10.1038/13503

Radulovic, M., Hippel, C., & Spiess, J. (2003). Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *Journal of Neurochemistry*, *84*(5), 1074–85. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603831

Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2007). Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5834), 124–7. doi:10.1126/science.1140488

Randall-Demllo, S., Chieppa, M., & ERI, R. D. (2013). INTESTINAL EPITHELIUM AND AUTOPHAGY: PARTNERS IN GUT HOMEOSTASIS. *Frontiers in Immunology*, *4*(301). doi:10.3389/fimmu.2013.00301

Raufman, J.-P., Cheng, K., Saxena, N., Chahdi, A., Belo, A., Khurana, S., & Xie, G. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate matrix metalloproteinase 1-dependent invasion of human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *415*(2), 319–24. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.052

Raufman, J.-P., Samimi, R., Shah, N., Khurana, S., Shant, J., Drachenberg, C., … Cheng, K. (2008). Genetic ablation of M3 muscarinic receptors attenuates murine colon epithelial cell proliferation and neoplasia. *Cancer Research*, *68*(10), 3573–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6810

Reynolds, A. B., Roesel, D. J., Kanner, S. B., & Parsons, J. T. (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Molecular and Cellular Biology*, *9*(2), 629–38. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=362640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., … Hodivala-Dilke, K. M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nature Medicine*, *8*(1), 27–34. doi:10.1038/nm0102-27

Reyt, S., Picq, C., Sinniger, V., Clarençon, D., Bonaz, B., & David, O. (2010). Dynamic Causal Modelling and physiological confounds: a functional MRI study of vagus nerve stimulation. *NeuroImage*, *52*(4), 1456–64. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.05.021

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, *70*(3), 401–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1643658

Rigby, R. J., Simmons, J. G., Greenhalgh, C. J., Alexander, W. S., & Lund, P. K. (2007). Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene*, *26*(33), 4833–41. doi:10.1038/sj.onc.1210286

Riggleman, B., Schedl, P., & Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell*, *63*(3), 549–560. doi:10.1016/0092-8674(90)90451-J

Roczniak-Ferguson, A., & Reynolds, A. B. (2003). Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 20), 4201–12. doi:10.1242/jcs.00724

Roovers, K., & Assoian, R. K. (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *22*(9), 818–26. doi:10.1002/1521-1878(200009)22:9<818::AID-BIES7>3.0.CO;2-6

Rørth, P. (2009). Collective cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *25*, 407–29. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113231

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., … Tracey, K. J. (2011). Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* , *334* (6052), 98–101. doi:10.1126/science.1209985

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., García de Herreros, A., & Duñach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(51), 36734–40. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593980

Roy, H. K., Smyrk, T. C., Koetsier, J., Victor, T. A., & Wali, R. K. (2005). The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, *50*(1), 42–6.

Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe*, *14*(2), 195–206. doi:10.1016/j.chom.2013.07.012

Rudra, T., Motley, R., & Rhodes, J. (1989). Does smoking improve colitis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, *170*, 61–3; discussion 66–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2617195

Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., … Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, *15*(7), 741–750. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/ncb2757

Russo, P., Nastrucci, C., Alzetta, G., & Szalai, C. (2011). Tobacco habit: historical, cultural, neurobiological, and genetic features of people's relationship with an addictive drug. *Perspectives in Biology and Medicine*, *54*(4), 557–77. doi:10.1353/pbm.2011.0047

Sääf, A. M., Halbleib, J. M., Chen, X., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Nelson, W. J., & Brown, P. O. (2007). Parallels between global transcriptional programs of polarizing Caco-2 intestinal epithelial cells in vitro and gene expression programs in normal colon and colon cancer. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(11), 4245–60. doi:10.1091/mbc.E07-04-0309

Saeed, R. W., Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., … Metz, C. N. (2005). Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(7), 1113–23. doi:10.1084/jem.20040463

Saitoh, T., & Akira, S. (2010). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *The Journal of Cell Biology*, *189*(6), 925–35. doi:10.1083/jcb.201002021

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *19*(3), 183–232. doi:10.1016/1040-8428(94)00144-I

Samowitz, W. S., Albertsen, H., Herrick, J., Levin, T. R., Sweeney, C., Murtaugh, M. A., … Slattery, M. L. (2005). Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*, *129*(3), 837–45. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.020

Sánchez de Medina, F., Vera, B., Gálvez, J., & Zarzuelo, A. (2002). Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences*, *70*(26), 3097–3108. doi:10.1016/S0024-3205(02)01568-0

Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., & Yamamoto-Furusho, J.-K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *14*(27), 4280–8. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., & Postigo, A. (2011). β-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(48), 19204–9. doi:10.1073/pnas.1108977108

Sandborn WJ, Loftus EV, Colombel JF, Fleming KA, S., F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJHarmsen WS, Zinsmeister AR, T., SR., & Kaul DK, W. J. (2001). Evaluation of serologic disease markers in a populationbased cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, *7*(192-20).

Sander, G. R., & Powell, B. C. (2004). Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *52*(4), 509–16. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034002

Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, *40*(7), 915–20. doi:10.1038/ng.165

Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1999a). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *The American Journal of Physiology*, *277*(2 Pt 1), G391–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444454

Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (1999b). Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *The American Journal of Physiology*, *277*(2 Pt 1), G391–9. Retrieved from http://ajpgi.physiology.org/content/277/2/G391.abstract

Santos, J., Yang, P. C., Söderholm, J. D., Benjamin, M., & Perdue, M. H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*, *48*(5), 630–6. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1728291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Santos, J., Yates, D., Guilarte, M., Vicario, M., Alonso, C., & Perdue, M. H. (2008). Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(9), 1248–56. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.07.002

Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, *3*(7), 390–407. doi:10.1038/ncpgasthep0528

Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Fukuda, T., Torii, A., & Sasano, H. (2005). Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides*, *26*(7), 1196–206. doi:10.1016/j.peptides.2005.01.014

Saruta, M., Takahashi, K., Suzuki, T., Torii, A., Kawakami, M., & Sasano, H. (2004). Urocortin 1 in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(11), 5352–61. doi:10.1210/jc.2004-0195

Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., … Kaibuchi, K. (2011). Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(17), 3103–19. doi:10.1091/mbc.E11-03-0274

Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van den Brink, S., … Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, *141*(5), 1762–72. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050

Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., … Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–8. doi:10.1038/nature09637

Saunders, P. R., Santos, J., Hanssen, N. P. M., Yates, D., Groot, J. A., & Perdue, M. H. (2002). Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Digestive Diseases and Sciences*, *47*(1), 208–15. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11852879

Schackmann, R. C. J., Tenhagen, M., van de Ven, R. A. H., & Derksen, P. W. B. (2013). p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 16), 3515–25. doi:10.1242/jcs.134411

Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., & Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of Cell Biology*, *130*(5), 1181–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Scharl, M., & Rogler, G. (2012). The role for protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 in regulating autophagosome formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1257*, 93–102. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06578.x

Scharl, M., Wojtal, K. A., Becker, H. M., Fischbeck, A., Frei, P., Arikkat, J., … Rogler, G. (2012). Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 regulates autophagosome formation in human intestinal cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, *18*(7), 1287–302. doi:10.1002/ibd.21891

Scher, J. U., & Pillinger, M. H. (2005). 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *114*(2), 100–9. doi:10.1016/j.clim.2004.09.008

Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Müller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z, H. M. (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med.*, *38*(5), 651–61.

Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *286*(6), C1213–28. doi:10.1152/ajpcell.00558.2003

Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz, J., & Pinçon-Raymond, M. (2002). Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 3), 543–52.

Schuller, H. M. (2009). Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nature Reviews. Cancer*, *9*(3), 195–205. doi:10.1038/nrc2590

Schulzke, J. D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., … Fromm, M. (2009). Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1165*, 294–300. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04062.x

Schwartz, M. A., & Assoian, R. K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 14), 2553–60. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683383

Scudamore, C. L., Jepson, M. A., Hirst, B. H., & Miller, H. R. (1998). The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *European Journal of Cell Biology*, *75*(4), 321–30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9628318

Selye, H. (1956). What is stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, *5*(5), 525–30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13358567

Selye, H. (1976). Further thoughts on "stress without distress". *Medical Times*, *104*(11), 124–44. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/994775

Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., & Shimomura, A. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Medical Molecular Morphology*, *40*(2), 68–81. doi:10.1007/s00795-006-0352-5

Sengupta, N., & MacDonald, T. T. (2007). The role of matrix metalloproteinases in stromal/epithelial interactions in the gut. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *22*, 401–9. doi:10.1152/physiol.00027.2007

Serban, D. E. (2014). Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, *345*(2), 258–70. doi:10.1016/j.canlet.2013.08.013

Shahbazi, M. N., Megias, D., Epifano, C., Akhmanova, A., Gundersen, G. G., Fuchs, E., & Perez-Moreno, M. (2013). CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions. *The Journal of Cell Biology*, *203*(6), 1043–61. doi:10.1083/jcb.201306019

Shapiro, Fannon, Kwong, Thompson, Lehmann, Grubel, L. (1995). structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.

Sharma, G., Grybko, M., & Vijayaraghavan, S. (2008). Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3-mossy fiber synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(10), 2563–75. doi:10.1523/JNEUROSCI.5407-07.2008

Shields, J. M., Christy, R. J., & Yang, V. W. (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(33), 20009–17. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2330254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Shin, V. Y., Wu, W. K. K., Chu, K.-M., Wong, H. P. S., Lam, E. K. Y., Tai, E. K. K., … Cho, C.-H. (2005). Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor-associated invasion and angiogenesis in gastric cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, *3*(11), 607–15. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0106

Shin, V. Y., Wu, W. K. K., Ye, Y.-N., So, W. H. L., Koo, M. W. L., Liu, E. S. L., … Cho, C.-H. (2004). Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*, *25*(12), 2487–95. doi:10.1093/carcin/bgh266

Shioiri, M., Shida, T., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Nishimura, M., … Miyazaki, M. (2006). Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *British Journal of Cancer*, *94*(12), 1816–22. doi:10.1038/sj.bjc.6603193

Shore, E. M., & Nelson, W. J. (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(29), 19672–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918074

Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., & Di Fiore, P. P. (2012). Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological Reviews*, *92*(1), 273–366. doi:10.1152/physrev.00005.2011

Simasko, S. M., Soares, J. R., & Weiland, G. A. (1986). Two components of carbamylcholine-induced loss of nicotinic acetylcholine receptor function in the neuronal cell line PC12. *Molecular Pharmacology*, *30*(1), 6–12. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3724745

Simo, P., Simon-Assmann, P., Arnold, C., & Kedinger, M. (1992). Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells. *Journal of Cell Science*, *101 (Pt 1*, 161–71. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1569121

Simo, P., Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Leberquier, C., Kedinger, M., Ekblom, P., & Sorokin, L. (1991). Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development (Cambridge, England)*, *112*(2), 477–87.

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

Sinha, K., Dannelly, H. K., & Ghosh, S. K. (2001). Effects of T-lymphocyte-dependent and -independent immunity on cholinergic enzyme activity in mouse lacrimal gland. *Experimental Physiology* , *86* (2), 169–176. Retrieved from http://ep.physoc.org/content/86/2/169.abstract

Smith, K. J., Johnson, K. A., Bryan, T. M., Hill, D. E., Markowitz, S., Willson, J. K., … Vogelstein, B. (1993). The APC gene product in normal and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(7), 2846–50. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Söderholm, J. D., Yang, P.-C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P. M., & Perdue, M. H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology*, *123*(4), 1099–108. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360472

Somanath, P. R., Malinin, N. L., & Byzova, T. V. (2009). Cooperation between integrin alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*, *12*(2), 177–85. doi:10.1007/s10456-009-9141-9

Song, P., Sekhon, H. S., Fu, X. W., Maier, M., Jia, Y., Duan, J., … Spindel, E. R. (2010). Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Life Sciences*, *68*(12), 4693–4700. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0183.Activated

Söreide, K., Janssen, E. A. M., Söiland, H., Körner, H., & Baak, J. P. A. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *The British Journal of Surgery*, *93*(4), 395–406. doi:10.1002/bjs.5328

Sougioultzis, S., Simeonidis, S., Bhaskar, K. R., Chen, X., Anton, P. M., Keates, S., … Kelly, C. P. (2006). Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *343*(1), 69–76. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.080

Spasic, D., & Annaert, W. (2008). Building gamma-secretase: the bits and pieces. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 4), 413–20. doi:10.1242/jcs.015255

Spiess, J., Dautzenberg, F. M., Sydow, S., Hauger, R. L., Rühmann, A., Blank, T., & Radulovic, J. (1998). Molecular Properties of the CRF Receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *9*(4), 140–5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406257

Stairs, D. B., Bayne, L. J., Rhoades, B., Vega, M. E., Waldron, T. J., Kalabis, J., … Rustgi, A. K. (2011). Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, *19*(4), 470–83. doi:10.1016/j.ccr.2011.02.007

Stengel, A., & Taché, Y. (2014). CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 52. doi:10.3389/fnins.2014.00052

Strugala, V., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. (2008). Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *International Journal of Clinical Practice*, *62*(5), 762–9. doi:10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x

Sturm, A., & Dignass, A. U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *14*(3), 348–53. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2679124&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Stutzmann, J., Bellissent-Waydelich, A., Fontao, L., Launay, J. F., & Simon-Assmann, P. (2000). Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microscopy Research and Technique*, *51*(2), 179–90. doi:10.1002/1097-0029(20001015)51:2<179::AID-JEMT9>3.0.CO;2-4

Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., … Turner, J. R. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology*, *136*(2), 551–63. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.081

Sundaram, U., & West, A. B. (1997). Effect of chronic inflammation on electrolyte transport in rabbit ileal villus and crypt cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *272*(4), G732–741. Retrieved from http://ajpgi.physiology.org/content/272/4/G732

Sundaram, U., Wisel, S., & Fromkes, J. J. (1998). Unique mechanism of inhibition of Na+-amino acid cotransport during chronic ileal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *275*(3), G483–489. Retrieved from http://ajpgi.physiology.org/content/275/3/G483

Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., & Hazan, R. B. (2002). A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*, *2*(4), 301–14.

Swinny, J. D., & Valentino, R. J. (2006). Corticotropin-releasing factor promotes growth of brain norepinephrine neuronal processes through Rho GTPase regulators of the actin cytoskeleton in rat. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(9), 2481–90. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05129.x

Szlosarek, P. W., & Balkwill, F. R. (2003). Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *The Lancet Oncology*, *4*(9), 565–73. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12965278

Taché, Y., & Bonaz, B. (2007). Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 33–40. doi:10.1172/JCI30085

Taché, Y., & Perdue, M. H. (2004). Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *16 Suppl 1*, 137–42. doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00490.x

Tahri, N. (2007). [Treatment adherence and chronic inflammatory bowel diseases]. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, *36*(9 Pt 2), 1236–43. doi:10.1016/j.lpm.2007.01.010

Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., & Rikitake, Y. (2008). The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *24*, 309–42. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175339

Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., & Ikeda, W. (2003). Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Science*, *94*(8), 655–67. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12901789

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(8), 603–15. doi:10.1038/nrm2457

Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M. F., & Taketo, M. M. (1998). Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell*, *92*(5), 645–56. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506519

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science (New York, N.Y.)*, *334*(6061), 1420–4. doi:10.1126/science.1213214

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, *7*(5), 619–27. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573335

Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(1), 11–20. doi:10.1038/nrn2043

Taupin, D., & Podolsky, D. K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *4*(9), 721–32. doi:10.1038/nrm1203

Te Velde, A. A., de Kort, F., Sterrenburg, E., Pronk, I., ten Kate, F. J. W., Hommes, D. W., & van Deventer, S. J. H. (2007). Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *13*(3), 325–30. doi:10.1002/ibd.20079

Teitelbaum, A. A., Gareau, M. G., Jury, J., Yang, P. C., & Perdue, M. H. (2008). Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(3), G452–9. doi:10.1152/ajpgi.90210.2008

Teli, T., Markovic, D., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2005). Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *19*(2), 474–90. doi:10.1210/me.2004-0275

Teller, I. C., & Beaulieu, J.-F. (2004). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *3*(24), 1–18. doi:10.1017/S1462399401003623

Terg, R., Sambuelli, A., Coronel, E., Mazzuco, J., Cartier, M., Negreira, S., … Abecasis, R. (2008). Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. A large prospective study. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, *38*(1), 26–33. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533354

Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, *398*(6726), 422–6. doi:10.1038/18884

Thaker, P. H., Lutgendorf, S. K., & Sood, A. K. (2007). The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(4), 430–3. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312398

The, F. O., Boeckxstaens, G. E., Snoek, S. A., Cash, J. L., Bennink, R., Larosa, G. J., … de Jonge, W. J. (2007). Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology*, *133*(4), 1219–28. doi:10.1053/j.gastro.2007.07.022

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007

Thoreson, M. a, Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., … Reynolds, a B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *The Journal of Cell Biology*, *148*(1), 189–202. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2156209&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*(7368), 255–9. doi:10.1038/nature10408

Toyota, M., & Suzuki, H. (2010). Epigenetic drivers of genetic alterations. *Advances in Genetics*, *70*, 309–23. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60011-3

Tracey, K. J. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia . *Nature* . Retrieved from http://dx.doi.org/10.1107/S0108767396000967

Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex . *Nature* . Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nature01321

Travassos, L. H., Carneiro, L. a M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J. G., … Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, *11*(1), 55–62. doi:10.1038/ni.1823

Troughton, W. D., & Trier, J. S. (1969). Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *The Journal of Cell Biology*, *41*(1), 251–68. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2107723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Troyanovsky, R. B., Klingelhöfer, J., & Troyanovsky, S. M. (2011). α-Catenin contributes to the strength of E-cadherin-p120 interactions. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(22), 4247–55. doi:10.1091/mbc.E11-03-0250

Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(4), 285–93. doi:10.1038/35067088

Turck, N., Gross, I., Gendry, P., Stutzmann, J., Freund, J.-N., Kedinger, M., … Launay, J.-F. (2005). Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research*, *303*(2), 494–503. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.025

Turck, N., Lefebvre, O., Gross, I., Gendry, P., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., & Launay, J.-F. (2006). Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *Journal of Cellular Physiology*, *206*(2), 545–55. doi:10.1002/jcp.20501

Turnbull, A. V, & Rivier, C. (1997). Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *215*(1), 1–10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142133

Ueda, H., Morishita, R., Itoh, H., Narumiya, S., Mikoshiba, K., Kato, K., & Asano, T. (2001). Galpha11 induces caspase-mediated proteolytic activation of Rho-associated kinase, ROCK-I, in HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(45), 42527–33. doi:10.1074/jbc.M102529200

Uitto, J., Richard, G., & McGrath, J. A. (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Experimental Cell Research*, *313*(10), 1995–2009. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.029

Utton, M. A., Eickholt, B., Howell, F. V, Wallis, J., & Doherty, P. (2001). Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells. *Journal of Neurochemistry*, *76*(5), 1421–30.

Vachon, P. H., & Beaulieu, J. F. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*, *103*(2), 414–23. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1634060

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science (New York, N.Y.)*, *213*(4514), 1394–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6267699

Van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., … Clevers, H. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, *111*(2), 241–50. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408868

Van der Meulen, T., Xie, R., Kelly, O. G., Vale, W. W., Sander, M., & Huising, M. O. (2012). Urocortin 3 marks mature human primary and embryonic stem cell-derived pancreatic alpha and beta cells. *PloS One*, *7*(12), e52181. doi:10.1371/journal.pone.0052181

Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., … Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, *131*(1), 117–29. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.020

Van der Zanden, E. P., Snoek, S. A., Heinsbroek, S. E., Stanisor, O. I., Verseijden, C., Boeckxstaens, G. E., … De Jonge, W. J. (2009). Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor alpha4beta2. *Gastroenterology*, *137*(3), 1029–39, 1039.e1–4. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.057

Van Dop, W. A., Uhmann, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., … van den Brink, G. R. (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology*, *136*(7), 2195–2203.e1–7. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.068

Van Engeland, M., Derks, S., Smits, K. M., Meijer, G. A., & Herman, J. G. (2011). Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(10), 1382–91. doi:10.1200/JCO.2010.28.2319

Van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., … Clevers, H. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, *435*(7044), 959–63. doi:10.1038/nature03659

Van Kolen, K., Dautzenberg, F. M., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., & Peeters, P. J. (2010). Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology*, *58*(1), 135–44. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.06.022

Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M. M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., … Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *300*(6), G976–87. doi:10.1152/ajpgi.00427.2010

Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Teusan, R., Léger, J., Guisle, I., Houlgatte, R., & Neunlist, M. (2009). Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics*, *10*, 507. doi:10.1186/1471-2164-10-507

Van Roy, F. (2014). Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(2), 121–34. doi:10.1038/nrc3647

Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *65*(23), 3756–88. doi:10.1007/s00018-008-8281-1

Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., & Kühn, K. (1991). Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. *The Journal of Cell Biology*, *113*(6), 1475–83.

Vespa, A., D'Souza, S. J. A., & Dagnino, L. (2005). A novel role for integrin-linked kinase in epithelial sheet morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(9), 4084–95. doi:10.1091/mbc.E05-02-0087

Wagenaar-Miller, R. A., Gorden, L., & Matrisian, L. M. (2004). Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Reviews*, *23*(1-2), 119–35. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000153

Waldner, M., Schimanski, C.-C., & Neurath, M.-F. (2006). Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *12*(45), 7233–8. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4087478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Walker, E. A., Gelfand, A. N., Gelfand, M. D., & Katon, W. J. (1995). Psychiatric diagnoses, sexual and physical victimization, and disability in patients with irritable bowel syndrome or inflammatory bowel disease. *Psychological Medicine*, *25*(6), 1259–67. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637955

Wang, H., Radjendirane, V., Wary, K. K., & Chakrabarty, S. (2004). Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells. *Oncogene*, *23*(32), 5558–61. doi:10.1038/sj.onc.1207701

Wang, H., & Sun, X. (2005). Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(3), 420–37. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.09.003

Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., … Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor [alpha]7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421*(6921), 384–388. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nature01339

Wang, J., Jin, L., Chen, J., & Li, S. (2010). Activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits the growth of human small cell lung carcinoma cells. *Cancer Investigation*, *28*(2), 146–55. doi:10.3109/07357900903179617

Wang, J., Xu, Y., Xu, Y., Zhu, H., Zhang, R., Zhang, G., & Li, S. (2008). Urocortin's inhibition of tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma via corticotrophin-releasing factor receptor 2. *Cancer Investigation*, *26*(4), 359–68. doi:10.1080/07357900701788106

Wang, N., Liu, Z.-H., Ding, F., Wang, X.-Q., Zhou, C.-N., & Wu, M. (2002). Down-regulation of gut-enriched Kruppel-like factor expression in esophageal cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *8*(6), 966–70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439907

Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., … Levine, B. (2012). Akt-Mediated Regulation of Autophagy and Tumorigenesis Through Beclin 1 Phosphorylation. *Science*, *338*(6109), 956–959. doi:10.1126/science.1225967

Wang, Z., & Li, S. S.-C. (n.d.). Numb: A new player in EMT. *Cell Adhesion & Migration*, *4*(2), 176–9.

Wang, Z., Sandiford, S., Wu, C., & Li, S. S.-C. (2009). Numb regulates cell-cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling. *The EMBO Journal*, *28*(16), 2360–73. doi:10.1038/emboj.2009.190

Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(1), 21–54. doi:10.1007/s00418-008-0420-0

Waterman, M., Xu, W., Stempak, J. M., Milgrom, R., Bernstein, C. N., Griffiths, A. M., … Silverberg, M. S. (2011). Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *17*(9), 1936–42. doi:10.1002/ibd.21579

Wehkamp, J., Schmid, M., & Stange, E. F. (2007). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, *23*(4), 370–8. doi:10.1097/MOG.0b013e328136c580

Wei, D., Kanai, M., Huang, S., & Xie, K. (2006). Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, *27*(1), 23–31. doi:10.1093/carcin/bgi243

Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Sumpter, R., Xiao, G., … Levine, B. (2013). EGFR-Mediated Beclin 1 Phosphorylation in Autophagy Suppression, Tumor Progression, and Tumor Chemoresistance. *Cell*, *154*(6), 1269–1284. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.015

Wilson, C. L., Heppner, K. J., Labosky, P. a, Hogan, B. L., & Matrisian, L. M. (1997). Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(4), 1402–7. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Wong, H. P. S., Yu, L., Lam, E. K. Y., Tai, E. K. K., Wu, W. K. K., & Cho, C. H. (2007). Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *221*(3), 261–7. doi:10.1016/j.taap.2007.04.002

Wong, H. P. S., Yu, L., Lam, E. K. Y., Tai, E. K. K., Wu, W. K. K., & Cho, C.-H. (2007). Nicotine Promotes Colon Tumor Growth and Angiogenesis through -Adrenergic Activation. *Toxicological Sciences*, *97*(2), 279–287. doi:10.1093/toxsci/kfm060

Wood, J. D., Alpers, D. H., & Andrews, P. L. (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut*, *45 Suppl 2*, II6–II16. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1766686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J., … Vogelstein, B. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5853), 1108–13. doi:10.1126/science.1145720

Wu, Y., Vendome, J., Shapiro, L., Ben-Shaul, A., & Honig, B. (2011). Transforming binding affinities from three dimensions to two with application to cadherin clustering. *Nature*, *475*(7357), 510–3. doi:10.1038/nature10183

Wypior, G., Jeschke, U., Kurpisz, M., & Szekeres-Bartho, J. (2011). Expression of CRH, CRH-related peptide and CRH receptor in the ovary and potential CRH signalling pathways. *Journal of Reproductive Immunology*, *90*(1), 67–73. doi:10.1016/j.jri.2011.04.009

Xiao, K., Oas, R. G., Chiasson, C. M., & Kowalczyk, A. P. (2007). Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(1), 8–16. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.005

Xie, G., Cheng, K., Shant, J., & Raufman, J. (2009). Acetylcholine-induced activation of M 3 muscarinic receptors stimulates robust matrix metalloproteinase gene expression in human colon cancer cells, *21201*, 755–763. doi:10.1152/ajpgi.90519.2008.

Xie, G., Drachenberg, C., Yamada, M., Wess, J., & Raufman, J.-P. (2005). Cholinergic agonist-induced pepsinogen secretion from murine gastric chief cells is mediated by M1 and M3 muscarinic receptors. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *289*(3), G521–9. doi:10.1152/ajpgi.00105.2004

Xu, M., Yamada, M., Li, M., Liu, H., Chen, S. G., & Han, Y. W. (2007). FadA from Fusobacterium nucleatum utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(34), 25000–9. doi:10.1074/jbc.M611567200

Xu, X.-R., Liu, C.-Q., Feng, B.-S., & Liu, Z.-J. (2014). Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(12), 3255–64. doi:10.3748/wjg.v20.i12.3255

Xu, Y., Hu, B., Choi, A.-J., Gopalan, B., Lee, B. H., Kalady, M. F., … Ting, A. H. (2012). Unique DNA methylome profiles in CpG island methylator phenotype colon cancers. *Genome Research*, *22*(2), 283–91. doi:10.1101/gr.122788.111

Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, *123*(5), 889–901. doi:10.1016/j.cell.2005.09.020

Yan, G. M., Lin, S. Z., Irwin, R. P., & Paul, S. M. (1995). Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Molecular Pharmacology*, *47*(2), 248–57. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870032

Yanagisawa, M., Huveldt, D., Kreinest, P., Lohse, C. M., Cheville, J. C., Parker, A. S., … Anastasiadis, P. Z. (2008). A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(26), 18344–54. doi:10.1074/jbc.M801192200

Yanagisawa, M., Kaverina, I. N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A. B., & Anastasiadis, P. Z. (2004). A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 9512–21. doi:10.1074/jbc.M310895200

Yang, W. L., & Frucht, H. (2000). Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, *21*(10), 1789–93. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023534

Yang, Y., Park, H., Yang, Y., Kim, T. S., Bang, S. I., & Cho, D. (2007). Enhancement of cell migration by corticotropin-releasing hormone through ERK1/2 pathway in murine melanoma cell line, B16F10. *Experimental Dermatology*, *16*(1), 22–7. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00511.x

Yap, A. S., Niessen, C. M., & Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *The Journal of Cell Biology*, *141*(3), 779–89. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Ozaki, N., Nara, K., Atou, K., Takada, E., … Suzuki, N. (2006). Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. *Clinical and Experimental Immunology*, *146*(1), 116–23. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03169.x

Yu, T., Chen, X., Zhang, W., Li, J., Xu, R., Wang, T. C., … Liu, C. (2012). Krüppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity. *PloS One*, *7*(2), e32492. doi:10.1371/journal.pone.0032492

Yuan, P.-Q., Million, M., Wu, S. V, Rivier, J., & Taché, Y. (2007). Peripheral corticotropin releasing factor (CRF) and a novel CRF1 receptor agonist, stressin1-A activate CRF1 receptor expressing cholinergic and nitrergic myenteric neurons selectively in the colon of conscious rats. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *19*(11), 923–36. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00978.x

Yuan, P.-Q., Wu, S. V., & Taché, Y. (2012). Urocortins and CRF type 2 receptor isoforms expression in the rat stomach are regulated by endotoxin: role in the modulation of delayed gastric emptying. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *303*(1), G20–31. doi:10.1152/ajpgi.00547.2011

Yuan, P.-Q., Wu, S. V, Wang, L., & Taché, Y. (2010). Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin. *Peptides*, *31*(2), 322–31. doi:10.1016/j.peptides.2009.11.012

Zecchini, V., Domaschenz, R., Winton, D., & Jones, P. (2005). Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes & Development*, *19*(14), 1686–91. doi:10.1101/gad.341705

Zeidler, R., Albermann, K., & Lang, S. (2007). Nicotine and apoptosis. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, *12*(11), 1927–43. doi:10.1007/s10495-007-0102-8

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., … Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, *56*(1), 61–72. doi:10.1136/gut.2006.094375

Zhang, J. (2013). Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biology*, *1*(1), 19–23. doi:10.1016/j.redox.2012.11.008

Zhang, Y.-Z. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(1), 91. doi:10.3748/wjg.v20.i1.91

Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., & Song, W. (2008). Campylobacter-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires Campylobacter-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infection and Immunity*, *76*(10), 4498–508. doi:10.1128/IAI.01317-07

Zhong, L., Zhang, X., & Covasa, M. (2014). Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *20*(24), 7878–7886. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7878

Zimring, J. C., Kapp, L. M., Yamada, M., Wess, J., & Kapp, J. A. (2005). Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *Journal of Neuroimmunology*, *164*(1-2), 66–75. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.03.018

Zmijewski, M. A., & Slominski, A. T. (2010). Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta Biochimica Polonica*, *57*(1), 1–13. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2883312&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Zucker, S., & Vacirca, J. (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *23*(1-2), 101–17. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000152

Zuckerman, S. H., Evans, G. F., & Guthrie, L. (1991). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology*, *73*(4), 460–5. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract