

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Biologie des organismes

Par

Anne-Gaëlle Le Loupp

Systeme nerveux entérique : source de prostaglandines D2 et E2.

Implication dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Thèse présentée et soutenue à la Faculté de Médecine de Nantes, le 21 décembre 2018

Unité de recherche : UMR1235

Rapporteurs avant soutenance :

Dr Hervé BLOTTIERE, Directeur de recherche, INRA, Institut Micalis, Paris

Dr Muriel JACQUIER-SARLIN, Maître de Conférences des Universités, Institut des Neurosciences, Grenoble

Composition du Jury :

Président de jury: Dr Hervé BLOTTIERE, Directeur de recherche, INRA, Institut Micalis, Paris

Examineurs :

DR Hervé BLOTTIERE, Directeur de recherche, INRA, Institut Micalis, Paris

Dr Muriel JACQUIER-SARLIN, Maître de Conférences des Universités, Institut des Neurosciences, Grenoble

Membre invité :

Dr Michel NEUNLIST, Directeur de recherche, UMR Inserm 1235, Nantes

Dir. de thèse :

Pr Damien Masson, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Faculté de médecine, Nantes

Co-dir. de thèse :

Dr Kalyane BACH-NGOHOU, Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de médecine, Nantes

Mes premiers remerciements vont à Damien Masson et Kalyane Bach pour l'encadrement de ce travail. Merci pour votre dynamisme, votre bonne humeur, vos conseils avisés, votre confiance et surtout votre soutien amical. Cela a toujours été un réel plaisir de travailler avec vous. Je mesure la chance d'avoir été formée à vos côtés !

Merci à Marc Denis qui a fortement participé à l'élaboration de ce travail.

Mes sincères remerciements aux membres du jury. Merci au Dr Muriel Jacquier-Sarlin et au Dr Hervé Blottière d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur.

Merci Michel de m'avoir accueillie au sein de l'unité et de me permettre aujourd'hui de présenter ce travail malgré mon changement de trajectoire professionnel qui m'a éloigné précocement de l'unité.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de l'UMR1235 pour leur accueil et leur disponibilité; en particulier ceux qui m'ont accompagné et conseillé au cours de ce travail : Malvyne Rolli-Derkinderen, Bernard Lardeux, Hélène Boudin, Arnaud Boureille, Catherine Leberre-scul, Julie, Philippe, Julien, mes collègues de master 2 et de thèse...et j'en passe, la liste est longue !

Merci à Anne Jarry et Anne-Sophie Duquoc pour leur participation précieuse au projet transcriptomique. Merci également à Anne Jarry pour ses conseils lors des comités de thèse.

A mes ex-collègues Nantais, Hélène, Thomas Nolwenn, Philippe...Je garde un excellent souvenir de ces quelques années passées à vos côtés.

A mes collègues Vannetais, pour la bonne ambiance qui règne au quotidien ! A notre nouveau labo et aux autres beaux projets à venir !

A mes amis qui n'ont pas vraiment compris quel était l'objectif de concrétiser cette thèse (Je vous rassure moi non plus...probablement la satisfaction d'être allé jusqu'au bout)

A ma famille, A mes parents,

A mes loulous, Jules et Romane, mes plus belles réussites

A toi Pierre, sans qui rien de cela ne serait possible

Liste des abréviations	6
Introduction générale.....	8
Revue de la littérature	10
I. Contexte clinique – les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin	10
a) Définition	10
b) Epidémiologie	10
c) Signes cliniques	13
d) Diagnostic	13
e) Stratégies thérapeutiques des MICI	17
f) Etiologie	22
(1) Facteurs génétiques.....	22
(2) Facteurs environnementaux	24
(3) Facteurs microbiens	25
II. L’unité neuro-glio-épithéliale.....	28
a) La barrière épithéliale intestinale.....	29
(1) Généralités	29
(2) Organisation de la BEI	30
(3) L’homéostasie de la barrière épithéliale intestinale	35
(4) Fonctions de la barrière épithéliale intestinale	37
(5) Altérations de la BEI dans les MICI.....	38
b) Le système nerveux entérique.....	42
(1) Généralités	42
(2) Les neurones entériques.....	44

(3) Les cellules gliales entériques	49
c) Les CGE : cibles ou acteurs dans les MICI?.....	55
(1) Modifications phénotypiques et fonctionnelles	55
(2) Altérations du profil lipidique des CGE	60
III. Prostaglandines D2 et E2.....	64
a) Voies de synthèse des prostaglandines	64
(1) Phospholipase A2	64
(2) Cyclooxygénases	65
(3) Les Prostaglandines E synthases	67
(4) Les Prostaglandines D synthases	70
b) Récepteurs des prostaglandines	72
(1) Récepteurs de la prostaglandine E2.....	72
(2) Récepteurs de la prostaglandine D2	75
c) Rôles des prostaglandines D2 et E2 dans les MICI.....	80
(1) La prostaglandine E2	81
(2) La prostaglandine D2.....	83
Objectifs de l'étude	86
Article I :	89
Article II :	103
Etude de l'impact de la PGD2 sur la muqueuse intestinale en conditions physiologiques....	127
Discussion	143
I. Le SNE, source de PGD2 et PGE2 en condition inflammatoire.....	143
II. Une balance PGD2/PGE2.....	145

III. Implication des voies métaboliques de la PGD2 et PGE2 dans la maladie de Crohn	
148	
IV. Rôle de la PGD2 sur la BEI en conditions physiologique et inflammatoire	155
Conclusion générale & perspectives	159
Bibliographie	160
Annexe 1 : revue médecine sciences	186
Annexe 2 : Clustering de l'analyse transcriptomique	191
Annexe 3 : Analyse transcriptionnelle des 7 gènes d'intérêts.....	192

Liste des abréviations

15d-PGJ2	15-désoxy-D12, 14-prostaglandine J2
11βPGF2	11beta-prostaglandine F2
5-HT	Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine
AA	Acide arachidonique
AC	Adénylate cyclase
Ach	Acetylcholine
AMPK	<i>5' adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BEI	Barrière épithéliale intestinale
CDAI	<i>Crohn's disease activity index</i>
CDEIS	<i>Crohn's disease endoscopic index of severity</i>
CEI	Cellule épithéliale intestinale
CGE	Cellule gliale entérique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
cPGES	Prostaglandine E synthase cytosolique
COX	Cyclooxygénase
CSI	Cellule souche intestinale
CRP	Protéine C réactive
CRTH2	<i>Chemoattractant receptor homologous molecule expressed on TH2 cells</i>
DACT2	<i>Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2</i>
ERG-1	<i>Early growth response 1</i>
GDNF	<i>Glial cell derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GNSO	Glutathion nitrosylé
HEPE	Acide hydroxyeicosapentaénoïque
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HPGDS	Hématopoïétique prostaglandine D synthase
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IPAN	Neurones afférents primaires intrinsèques
iPLA2	Phospholipase A2 intracellulaire
JAG1	<i>Jagged 1 ligand de Notch 1</i>
JAK3	<i>Janus Kinase 3</i>
LGALS3	<i>Lectin Galactoside-Binding Soluble, 3</i>
LOX	Lipooxygénase
LPGDS	Lipocaline prostaglandine D synthase

Liste des abbréviations

LPS	Lipopolysaccharides
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MC	Maladie de Crohn
MDP	Muramyl dipeptide
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
mPGES1	Prostaglandine E synthase microsomale 1
mPGES2	Prostaglandine E synthase microsomale 2
NFK β	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Monoxyde d'azote
NOD2	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2</i>
Nrf2	<i>Nuclear erythroid related factor 2</i>
PG	Prostaglandine
PGD2	Prostaglandine D2
PGDS	Prostaglandine D synthase
PGE2	Prostaglandine E2
PGES	Prostaglandine E synthase
PKA	Protéine kinase A
PBLD	<i>Phenazine Biosynthesis Like Domain</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PPR	<i>Pattern recognition receptors</i>
ProEGF	<i>Proepidermal growth factor</i>
RCH	Recto-colite hémorragique
RPS6KL1	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase Like 1</i>
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
sPLA2	Phospholipase A2 sécrétée
SUSD2	<i>Shushi Domain-containing protein 2</i>
TD	Tube digestif
TEER	Résistance transépithéliale électrique
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMF	Transplantation du microbiote fécal
TNF	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UCEIS	<i>Ulcerative colitis endoscopic index of severity</i>
UNGE	Unité neuro-glio-épithéliale
VIP	Peptide vasoactif intestinal
ZO	<i>Zonula occludens</i>

Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte clinique particulier, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) dont la prévalence est en constante augmentation. Les MICI comprennent la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH), caractérisées par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. L'origine des MICI est probablement multifactorielle associant des facteurs environnementaux, immunitaires et génétiques. Ainsi, la compréhension des différents mécanismes physiopathologiques impliqués constitue un enjeu important afin d'optimiser les stratégies thérapeutiques et proposer une meilleure prise en charge des patients.

L'un des éléments clés de la pathogénie des MICI semble être l'atteinte de la barrière épithéliale intestinale (BEI). En effet, lors d'une réponse inflammatoire, l'agression continue de l'épithélium provoque des érosions et des ulcérations qui modifient la perméabilité de la BEI. Ces altérations facilitent alors l'activation du système immunitaire muqueux et la réponse est amplifiée par le recrutement de cellules effectrices au site de l'inflammation. On retrouve également une dysrégulation de la prolifération et de la différenciation qui sont deux processus nécessaires au maintien de l'intégrité de la BEI.

Il est désormais admis que la BEI forme avec les cellules gliales entériques (CGE) et les neurones du système nerveux entérique (SNE), une unité fonctionnelle, l'unité neuro-glio-épithéliale (UNGE) dont le fonctionnement repose notamment sur la proximité physique des différents composants ainsi que sur des relations paracrines existant entre eux. Ainsi, le SNE est impliqué dans la régulation des fonctions et le contrôle de l'homéostasie de la BEI selon un mode paracrine, notamment *via* la sécrétion par les CGE de médiateurs solubles.

Dans les pathologies inflammatoires digestives, le SNE a d'abord été considéré comme une cible de l'inflammation devant l'observation de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles. Cependant, les modèles murins de destruction ciblée des CGE conduisant à une entéocolite fulminante suggèrent également son implication dans la physiopathologie des MICI et dans le maintien de l'intégrité de la barrière. En effet, on sait maintenant que le SNE, et en particulier les CGE, sont capables d'intégrer un signal inflammatoire et qu'en réponse à

ce signal, vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, des médiateurs lipidiques et proliférer.

Parmi les médiateurs lipidiques, on retrouve la classe des prostaglandines (PG). Des travaux au sein de l'unité ont d'ores et déjà montré que la 15d-PGJ2 et le 11 β PGF2 α , dérivés de la prostaglandine D2 (PGD2) et sécrétés par le SNE sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI. Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence des taux importants de PGD2 et de prostaglandine E2 (PGE2) dans des biopsies coliques de patients présentant une MICI et dans les modèles murins de colite. Ainsi, la PGD2 et PGE2 semblent à la fois impliquées dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI et participer à sa rupture en situation inflammatoire. De façon schématique, la voie de la PGD2 serait plutôt anti-inflammatoire alors que celle de la PGE2 serait à l'inverse pro-inflammatoire. Enfin, si l'effet de la PGE2 sur la BEI a déjà été en partie évalué, l'impact bénéfique ou délétère de la production de PGD2 sur la BEI n'a pas été encore caractérisé.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la relation paracrine impliquant la PGD2 et la PGE2 au sein de l'UNGE.

Les objectifs étaient les suivants :

1/ Caractériser les voies métaboliques de la PGD2 et la PGE2

- au sein du SNE en conditions physiologique et inflammatoire
- ainsi que leur implication dans la physiopathologie des MICI

2/ Etudier l'impact de la production de la PGD2 sur la BEI

Cette thèse est structurée autour de deux articles et d'un projet d'étude transcriptomique, précédés d'une étude bibliographique. L'étude bibliographique est composée des thèmes suivants :

1/ Présentation du contexte général dans lequel s'inscrit ce travail, à savoir les MICI

2/ Présentation de l'UNGE en condition physiologique et dans les MICI

3/ Description des voies métaboliques de la PGD2 et de la PGE2 et leur implication dans les MICI

Revue de la littérature

I. Contexte clinique – les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

a) Définition

Les MICI sont des pathologies liées à une inflammation chronique du système digestif et caractérisées par des ulcérations de la muqueuse et l'afflux de cellules immunitaires. Elles comprennent deux entités principales, à savoir : la MC et la RCH. Dans la MC, l'inflammation peut être localisée à tous les niveaux du système digestif, de la bouche à l'anus, même si elle est principalement localisée au niveau de l'intestin et atteindre toute l'épaisseur de la paroi digestive, allant jusqu'à la formation de profondes fistules. En revanche, dans la RCH, les manifestations sont limitées au côlon et l'infiltrat inflammatoire associé ne pénètre pas plus loin que la muqueuse et la lamina propria dans la plupart des cas (Fakhoury et al., 2014).

b) Epidémiologie

La prévalence et l'incidence des MICI ont augmenté ces dernières décennies à la fois chez l'adulte et chez l'enfant (Weimers and Munkholm, 2018).

Elles sont le plus souvent diagnostiquées chez des patients jeunes, âgés de 20 à 30 ans, même si pour la RCH, les tranches d'âges au diagnostic sont plus étendues, pouvant aller jusqu'à 39 ans. Elles peuvent néanmoins survenir à tous âges et 15 % des cas concernent des enfants. Certaines études ont également montré des profils différents en fonction du sexe. En effet, la MC est une pathologie qui atteint plus fréquemment les femmes (sex ratio homme/femme =

0.8) et la RCH, les hommes (sex ratio homme/femme = 1.1) (Lerebours et al., 2003) (Figure 1).

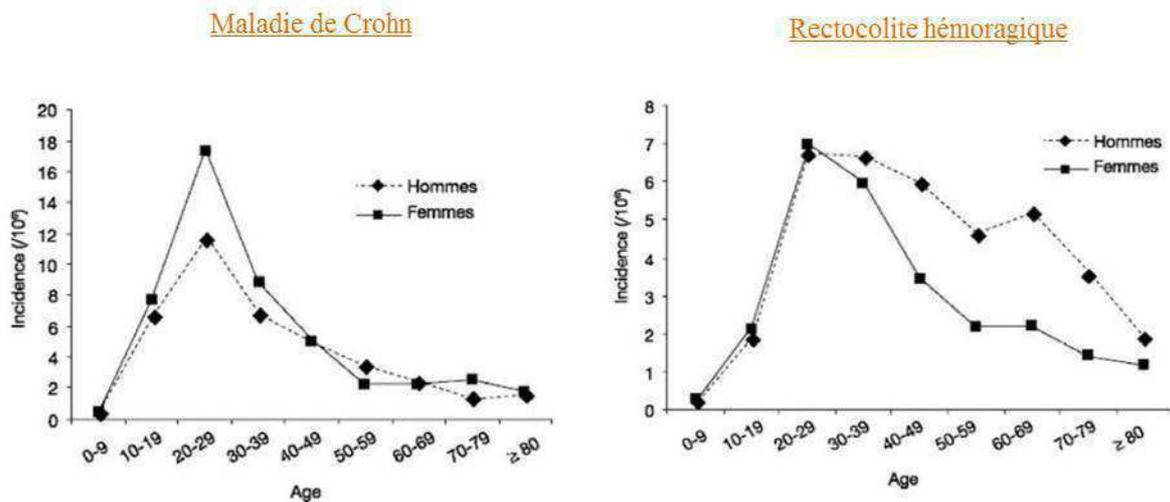


Figure 1: Variation de l'incidence de la MC et la RCH en fonction du sexe et de l'âge (D'après Lerebours et al., 2003)

L'incidence des MICI varie selon les pays. On observe une prédominance dans les pays occidentaux où leur prévalence est en constante augmentation probablement du fait d'une meilleure connaissance de ces pathologies. En Europe, on estime la prévalence de la RCH entre 0.6 à 24.3 par personne et par an pour 100 000 habitants et celle de la MC entre 0.3 à 12.7 (Ananthakrishnan, 2015). Cependant, les pays en voie d'occidentalisation (Afrique du nord, Chine, Inde, Corée du Sud, Iran et Liban) voient également l'incidence des MICI augmenter ces dernières années (Cosnes et al., 2011; Ng et al., 2013) (Figures 2 et 3). Il est commun de ce fait de penser que le risque de MICI est lié au développement socio-économique et à l'industrialisation.

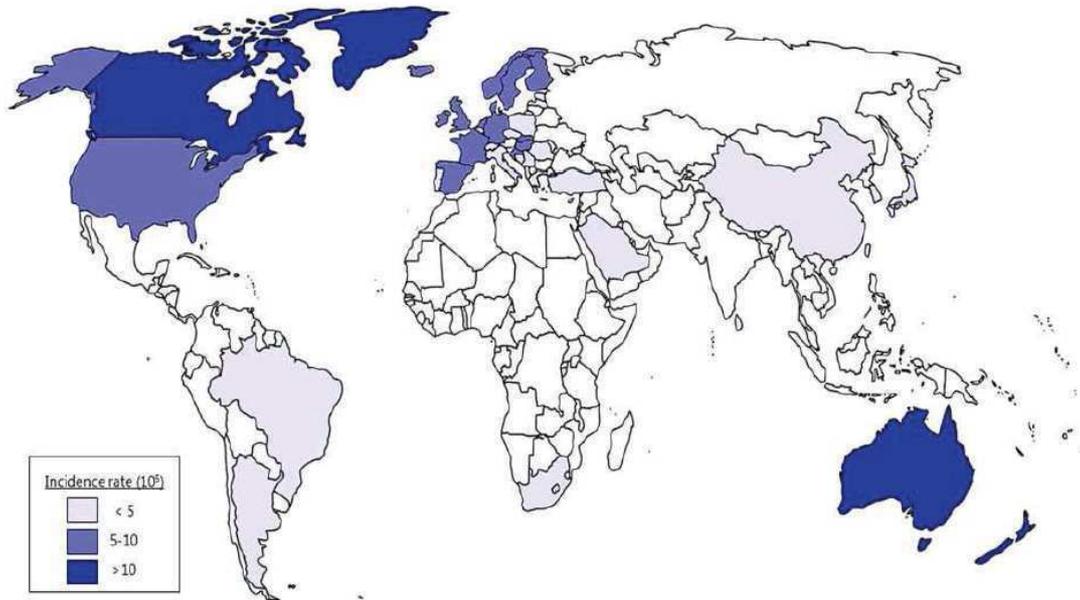


Figure 2: Carte de l'incidence de la maladie de Crohn dans le monde (D'après Ng et al., 2013)

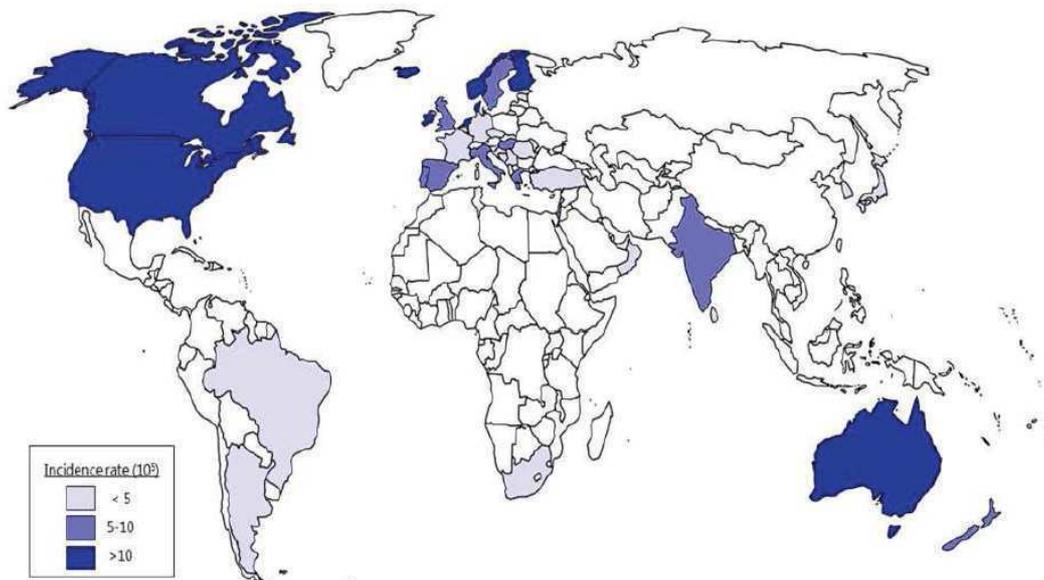


Figure 3: Carte de l'incidence de la rectocolite hémorragique dans le monde (D'après Ng et al., 2013)

c) Signes cliniques

L'évolution de ces pathologies se fait par poussées inflammatoires de durées et de fréquences variables selon les patients. Ces poussées sont entrecoupées de phases de rémission. Lors de la phase aiguë, les MICI se caractérisent par des douleurs abdominales, des diarrhées fréquentes, parfois sanglantes, ou encore une atteinte de la région anale (fissure, abcès). Ces symptômes typiques s'accompagnent souvent de fatigue, d'anorexie et de fièvre, voire de manifestations extra-intestinales (articulaires, cutanées, oculaires, hépatiques). Certaines crises peuvent conduire à l'hospitalisation du patient avec arrêt de l'alimentation et mise sous perfusion pendant quelques jours. L'évolution de la maladie peut entraîner des sténoses du grêle et du côlon pouvant se compliquer d'occlusions, de fistules puis d'abcès. Ces complications nécessitent une intervention chirurgicale. Les patients souffrant de MICI sont également exposés à un risque accru de développer un cancer colorectal. Ce risque commence à s'élever 8 à 10 ans après le diagnostic et atteint environ 8% à 20 ans et 18% après 30 ans (Kraus and Arber, 2009).

d) Diagnostic

Leur diagnostic est posé sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, endoscopiques et histologiques précis. Un score d'activité clinique (MC : *Crohn disease activity index* (CDAI) et RCH : Lichtiger) (Tableau 1) et endoscopique (MC : *Crohn's disease endoscopic index of severity* (CDEIS) et RCH : *Ulcerative colitis endoscopic index of severity* (UCEIS)) (tableau 2) est établi lors du bilan initial de la maladie et au cours du suivi.

Tableau 1: Score clinique- Exemple du CDAI ou indice de Best pour la Maladie de Crohn

(Extrait des fiches Mémo MICI du CREGG, Club de réflexion des cabinets et groupes d'hépatogastroentérologie ; un CDAI inférieur à 150 correspond à une maladie de Crohn inactive ; compris entre 150 et 450 à une maladie de Crohn active ; supérieur à 450 à une maladie de Crohn sévère)

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	Somme	Coefficient multiplicateur	Total
Nombre de selles liquides ou molles									2	
Douleurs abdominales : <ul style="list-style-type: none"> • absente – 0 • légères – 1 • moyennes – 2 • intenses – 3 									2	
Bien-être général : <ul style="list-style-type: none"> • bon – 0 • moyen – 2 • médiocre – 3 • mauvais – 4 • très mauvais – 5 									2	
Autres manifestations :										
arthrites ou arthralgies									20	
iritis ou uvéite									20	
érythème noueux, pyoderma, aphtes buccaux									20	
fissures, fistules, abcès anal ou périrectal									20	
autre fistule intestinale									20	
fièvre (> 38° dans la semaine)									20	
Traitement antidiarrhéique (loperamine ou opiacés) <ul style="list-style-type: none"> • non – 0 • oui – 1 									30	
Masse abdominale : <ul style="list-style-type: none"> • absente – 0 • douteuse – 1 • certaine – 5 									10	
Hématocrite* : <ul style="list-style-type: none"> • homme : 47 - Hématocrite • femme : 42 - Hématocrite 									6	
Poids* : 100 x (1-Poids actuel/Poids théorique)										
* Le signe doit être conservé donc ajout ou soustraction.										
									TOTAL	

Tableau 2: Score endoscopique - Exemple du CDEIS dans la maladie de Crohn

(Extrait des fiches Mémo MICI du CREGG, Club de réflexion des cabinets et groupes d'hépatogastroentérologie ; Le CDEIS varie de 0 (absence de lésions) à 44 (lésions les plus sévères). La rémission endoscopique peut être définie par un CDEIS ≤7)

	Rectum	Sigmoïde Colon gauche	Colon transverse	Colon droit	Ileon	Total
Ulcération superficielles (coter 6 points si +)		+	+	+	+	=
Ulcération profondes (coter 12 points si +)		+	+	+	+	=
Surface des lésions (%) (à diviser par 10)*		+	+	+	+	=
Surface ulcérée (%) (à diviser par 10)*		+	+	+	+	=
Sous-total A						=
Nombre de segments explorés (totalement ou partiellement)					n	=
Diviser le sous-total A par n					Sous-total B	=
Sténose ulcérée (3 points si +)						C =
Sténose non ulcérée (3 points si +)						D =
CDEIS = A + B + C + D						=

Lorsque les symptômes sont évocateurs d'une MICI, le bilan biologique pourra objectiver un syndrome inflammatoire ainsi que la présence éventuelle de marqueurs spécifiques des MICI tels que les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) et les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), ou encore d'éventuelles carences nutritionnelles.

Actuellement, le marqueur le plus étudié et le plus performant pour le diagnostic et la surveillance des MICI est la calprotectine dont le dosage est réalisé sur échantillon de selles. Cette protéine de liaison au calcium et au zinc, aux propriétés antibactériennes et antifongiques, est sécrétée par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes-macrophages en cas d'activation, stress, signaux de mort cellulaire ou après adhésion des monocytes circulants à l'endothélium vasculaire. Elle reflèterait mieux que les marqueurs inflammatoires sériques la présence et la sévérité d'une inflammation intestinale : 20% des patients atteints d'une MICI en poussée ont une CRP (protéine C réactive) normale, alors que les taux de calprotectine fécale sont quasiment toujours élevés. Malgré qu'elle soit non spécifique des MICI, la calprotectine fécale permet de discriminer avec une bonne sensibilité et spécificité (seuil de 50 µg/g), la présence de lésions des muqueuses du tube digestif observées dans les MICI, d'un syndrome fonctionnel comme celui de l'intestin irritable. Ce biomarqueur est tout aussi utile dans le suivi de l'efficacité du traitement mis en place et dans la prévention des poussées in-

flammatoires (Chew and Mansfield, 2018). Il est décrit que les rechutes et les complications de ces pathologies sont plus fréquentes lorsque persiste une inflammation résiduelle entre les poussées, même en l'absence de symptômes. La détection de cette inflammation *via* la calprotectine peut justifier l'intensification du traitement afin de parvenir à la cicatrisation de la muqueuse. En plus du bénéfice clinique, elle présente également un bénéfice économique puisque son recours peut limiter la réalisation d'une endoscopie.

L'endoscopie digestive permet de rechercher la présence et la localisation de lésions du tube digestif ainsi que de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique des lésions. Si nécessaire, pour évaluer l'atteinte de l'intestin grêle, une entéro-IRM peut compléter l'examen, en l'absence de sténose du grêle. Elle peut aussi se faire par entéro-scanner ou par l'utilisation d'une vidéo-capsule (gélule à avaler munie d'une micro-caméra). De nouvelles stratégies d'analyses endoscopiques prometteuses dont l'endomicroscopie confocale (figure 4) sont en cours de développement. Elles permettent d'analyser *in situ* l'état de l'épithélium intestinal, le flux sanguin et la perméabilité à des substances en permettant des analyses quantitatives avec plus d'exactitude que l'endoscopie « classique » (Musquer et al., 2013; Quénéhervé et al., 2015, 2018).

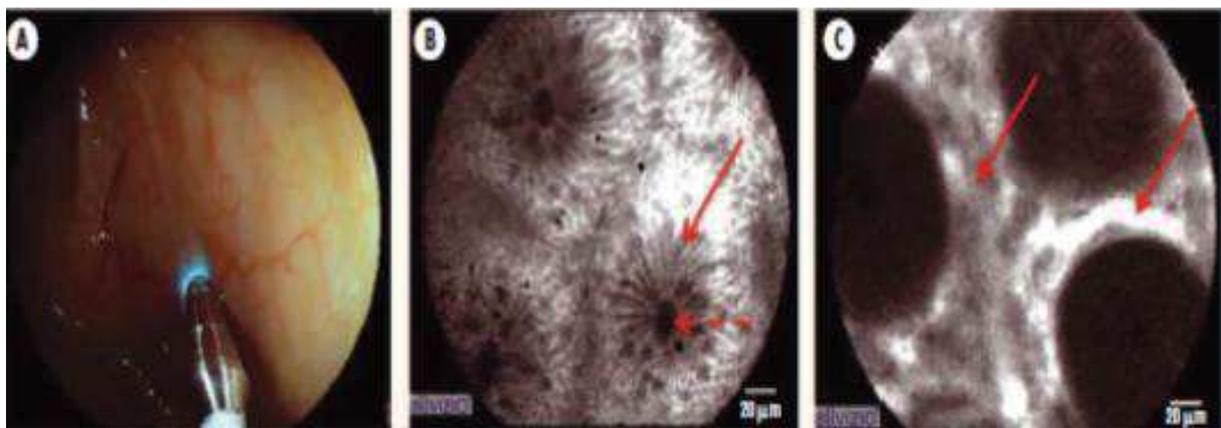


Figure 4: Apport de l'endomicroscopie confocale chez un patient atteint d'une Maladie de Crohn (D'après Quénéhervé et al., 2015)

(A/ Application de la fibre d'endomicroscopie sur la muqueuse colique ; B/ Visualisation de l'épithélium (flèche pleine) ainsi que des orifices des glandes coliques (flèche pointillée) à l'échelon microscopique et en temps réel ; C/ Visualisation des capillaires péricryptiques et analyse des flux capillaires)

e) Stratégies thérapeutiques des MICI

La prise en charge thérapeutique des MICI a pour objectifs la rémission des signes fonctionnels de la maladie, la prévention des rechutes et des complications ainsi que la limitation de la progression des lésions. Elle implique la mise en place de mesures hygiéno-diététiques avec un traitement médicamenteux qui va traiter la crise (traitement d'attaque) et limiter les rechutes (traitement d'entretien) (Figure 5). Si les patients sont résistants aux traitements médicamenteux ou encore suite à l'apparition de complications, un traitement chirurgical peut être proposé afin de retirer le segment du tube digestif (TD) le plus atteint.

Parmi les mesures hygiéno-diététiques importantes et présentant un réel effet bénéfique sur ces pathologies, on retrouve le sevrage tabagique et la pratique d'une activité physique. Du point de vue alimentaire, aucun régime spécifique n'est recommandé. Néanmoins, une alimentation pauvre en graisses et en sucres semble associée à des effets bénéfiques alors que la consommation d'alcool, de caféine et de plats épicés semble à l'inverse aggraver les symptômes. D'autre part, une supplémentation en acide folique, zinc, magnésium, vitamines B12 et D peut être réalisée en raison des carences dues à une malabsorption au cours de ces pathologies.

Un recours à la nutrition parentérale peut également s'avérer nécessaire durant les poussées inflammatoires aiguës, les complications sévères ou lors de dénutrition importante afin de limiter les stimuli de la muqueuse tout en permettant un apport en nutriments efficace.

Enfin, l'utilisation de probiotiques et prébiotiques semble également intéressante. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, non pathogènes. Quant aux prébiotiques, ils sont définis comme des ingrédients non digestibles qui stimulent la croissance ou l'activité de certaines bactéries résidant dans le côlon. Les deux présentent un rôle bénéfique pour l'équilibre microbien gastro-intestinal.

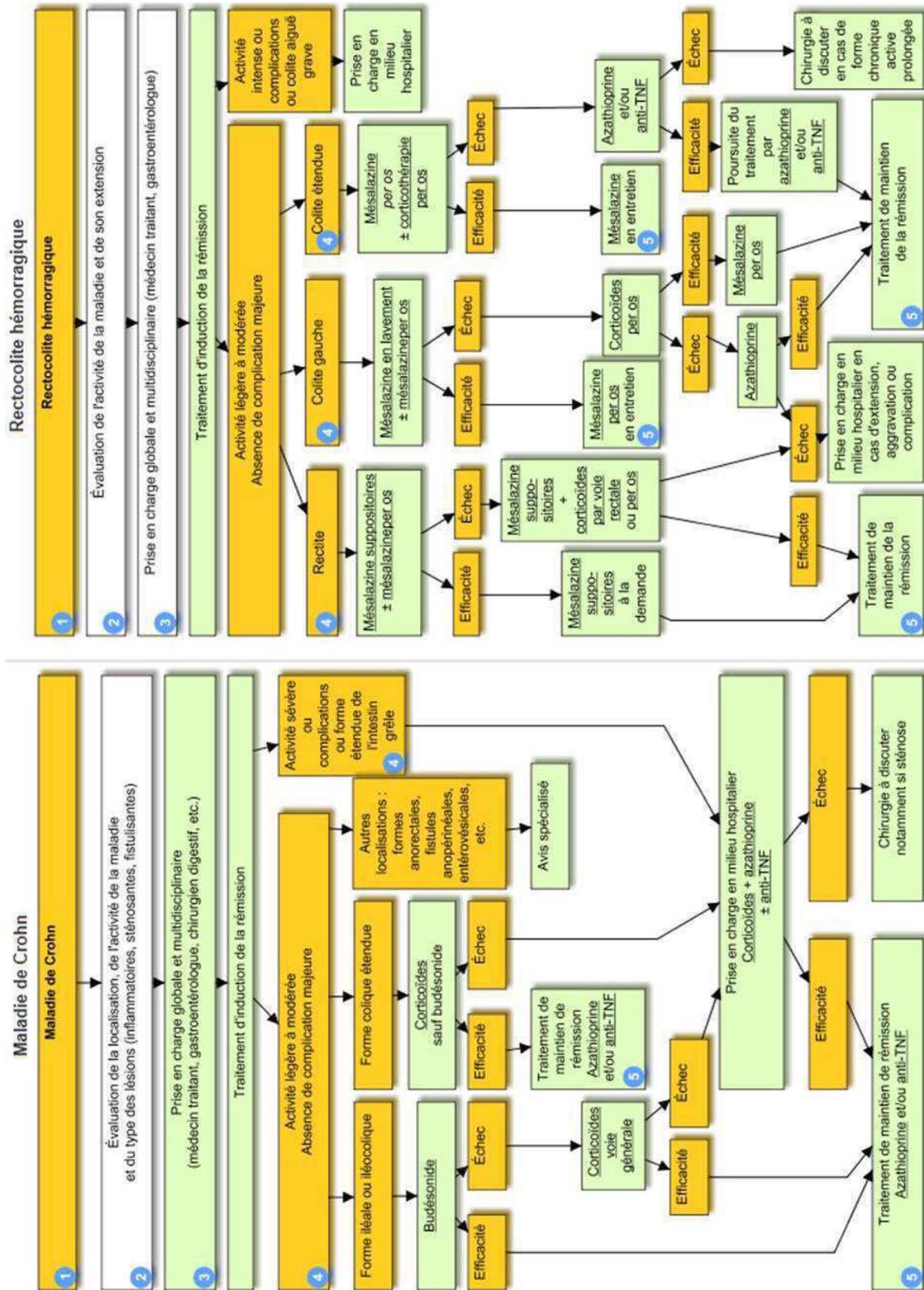


Figure 5: Organigramme des soins des patients présentant une MICI (eVidal 2018)

✓ Traitements médicamenteux

Actuellement, les traitements agissent sur les différentes phases de l'inflammation. Il n'existe pas de traitement curatif des MICI, mais les médicaments anti-inflammatoires actuels permettent un contrôle de la maladie. Ils préviennent l'apparition des poussées et prolongent les phases de rémission en favorisant la cicatrisation des lésions du tube digestif. Si les 5-aminosalicylés (5-ASA) ne sont pas efficaces dans la MC, ils peuvent être prescrits dans les formes modérées de RCH. Les corticoïdes sont quant à eux moins utilisés du fait de leurs effets secondaires. En cas de maladie évolutive, des traitements immunomodulateurs peuvent être mis en place. Les plus prescrits sont les anti-TNF α et anti-IL12/IL23. Ils bloquent spécifiquement les médiateurs de l'inflammation impliqués dans la maladie. Si ces derniers s'avèrent non efficaces, un relai avec de nouveaux immunomodulateurs spécifiques de l'intestin comme le vedolizumab (anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$) est réalisé. Il s'agit d'anticorps monoclonaux qui se lient spécifiquement à des molécules d'adhésion présentes à la surface de cellules immunitaires, empêchant leur passage dans le TD.

✓ Vers de nouvelles perspectives :

▪ La transplantation fécale

Un rôle important du microbiote intestinal est clairement démontré dans la physiopathologie des MICI. Il est maintenant considéré comme un organe à part entière et peut être transplanté (Gerding et al., 2015). La transplantation de microbiote fécal (TMF) consiste à administrer une préparation de matière fécale issue d'un sujet sain à un patient atteint d'une pathologie liée à une altération du microbiote intestinal, en vue d'exercer des effets thérapeutiques (Figure 6). A l'heure actuelle la seule indication validée est l'infection récidivante à *Clostridium difficile* avec des taux de succès de l'ordre de 80 à 90 % (van Nood et al., 2013). Les premiers essais de la TMF sont prometteurs. En ce sens, une étude récente dans la RCH montre qu'une rémission clinique et endoscopique est obtenue pour 11 (27%) des 41 patients ayant reçu une greffe de microbiote fécale versus trois (8%) des 40 qui ont reçu un placebo (Paramsothy et al., 2017). Cependant, la place et les modalités d'utilisation dans le traitement des MICI restent à être déterminées.

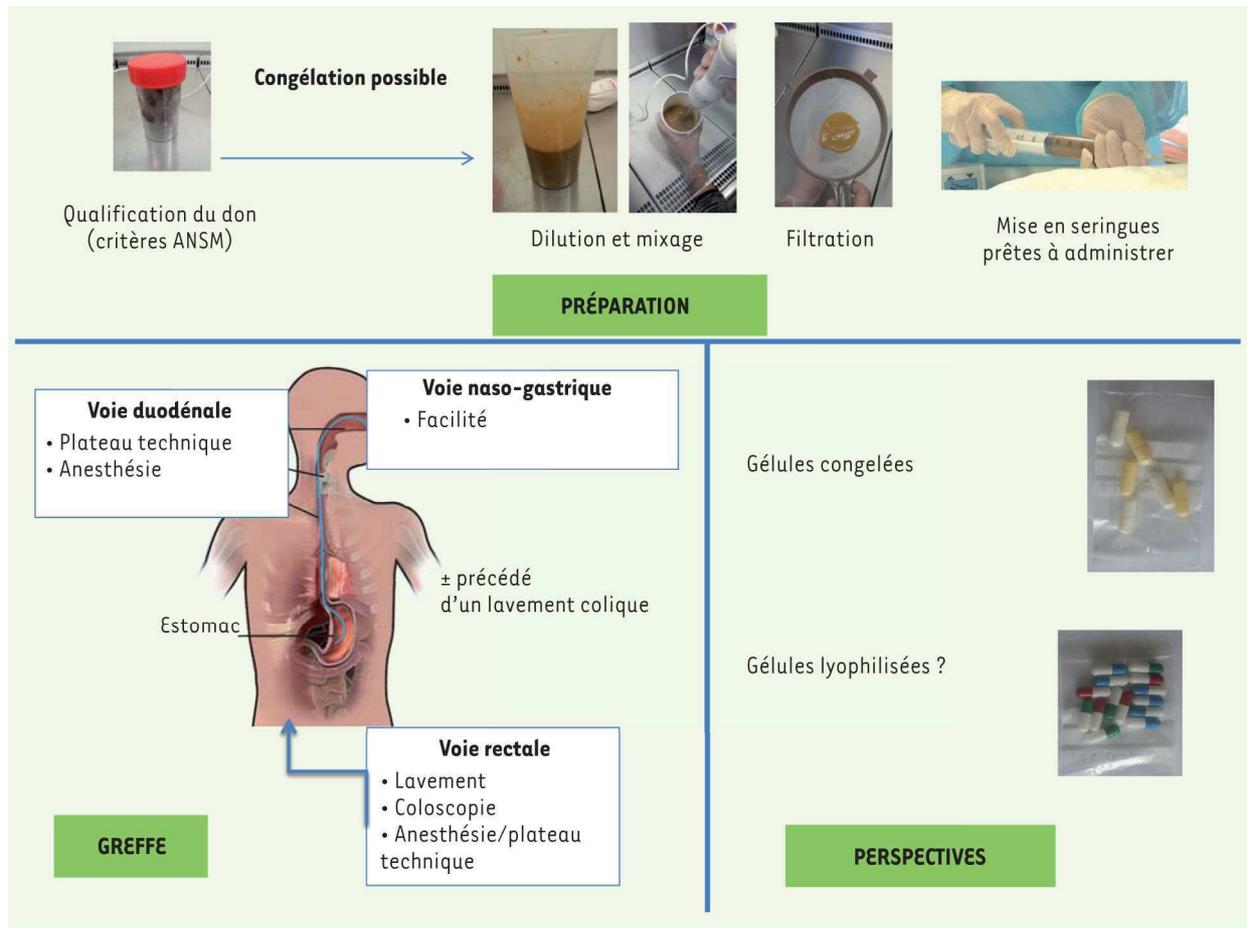


Figure 6: La transplantation fécale en pratique. ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament (D'après Lagier and Raoult, 2016)

▪ La neurostimulation

Dès 2000, Travey et son équipe ont décrit les propriétés anti-inflammatoires de la stimulation du nerf vague *via* la voie cholinergique. En effet, la stimulation du nerf vague conduit à la libération d'acétylcholine qui, en se fixant aux récepteurs α -7-nicotiniques exprimés à la surface des macrophages, inhibe la sécrétion du TNF α (Borovikova et al., 2000). Par la suite, il a été montré qu'une stimulation électrique du nerf vague améliorerait une colite expérimentale (Meregiani et al., 2011). Ainsi, la neurostimulation du nerf vague pourrait représenter une alternative intéressante à la prise en charge conventionnelle pour des patients présentant une MICI (Bonaz et al., 2017). Il en est de même pour la neurostimulation sacrée, technique déjà bien connue en pathologie digestive (Brégeon et al., 2015). En effet, les travaux de l'unité montrant que le SNE régule la perméabilité de la BEI, son activation par l'implantation d'un neurostimulateur intestinal pourrait être envisagée pour réduire la porosité de la BEI associée

aux MICI (Meurette et al., 2012a; Provost et al., 2015). Le rôle du SNE sur la BEI ainsi que l'altération de la BEI dans les MICI seront décrits dans un paragraphe suivant.

f) **Etiologie**

La pathogénie des MICI n'est pas encore totalement décryptée. Elles sont classiquement présentées comme la résultante d'une réponse inflammatoire/immune non contrôlée des muqueuses digestives à des facteurs environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés.

(I) *Facteurs génétiques*

L'existence d'une composante génétique dans la survenue des MICI a d'ores et déjà été démontrée notamment *via* les données épidémiologiques. En effet, on observe une hétérogénéité de la répartition des MICI (Lerebours et al., 2003), l'existence de formes familiales de MICI ainsi qu'une concordance de 50-60% chez des jumeaux monozygotes pour la MC (Orholm et al., 1991; Tysk et al., 1988).

Ces dernières années, de nombreuses études ont également été menées afin d'identifier des gènes de susceptibilité. Le premier à avoir été identifié pour la MC, situé sur le chromosome 16q12 est le gène NOD2 (*nucléotide-binding oligomerization domain 2*), également nommé CARD15 (*Caspase Recruitment Domain-containing protein*) (Hugot et al., 1996, Hugot et al., 2001). NOD2 code pour un récepteur intra-cellulaire impliqué dans la reconnaissance des composants bactériens, le muramyl dipeptide (MDP) dérivant des peptidoglycanes et non reconnu par les *Toll like receptors* (TLR). Ce dernier est exprimé majoritairement par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales intestinales. La liaison de MDP avec NOD2 déclenche une réaction inflammatoire. Ainsi, les mutations de NOD2, sont associées à une diminution de capacité de la barrière digestive à lutter contre les bactéries (Strober et al., 2014). NOD2 est également impliqué dans la régulation d'autres fonctions essentielles pour le maintien de l'homéostasie intestinale (Strober et al., 2014) et participerait à la production d'IL10, cytokine anti-inflammatoire d'intérêt majeur pour l'intestin (Parkes, 2012). Trois mutations sont prépondérantes et susceptibles d'induire une MC. Néanmoins, la présence d'un variant de ce gène n'est ni nécessaire ni suffisant au déclenchement d'une MC puisque un variant de

ce gène n'est présent que chez 1 malade sur 2 et également chez 15% des sujets sains (Lesage et al., 2002).

Depuis la découverte de NOD2, l'essor des études génétiques à large échelle, a permis d'identifier plus de 170 gènes ou polymorphismes de susceptibilité impliqués dans la prédisposition aux MICI (Wang et al., 2005c). Si pour la majorité d'entre eux, les rôles respectifs dans la pathogénie des MICI font encore l'objet de nombreuses recherches, il est intéressant de noter qu'ils codent pour des protéines impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que l'immunité, l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique ou encore l'intégrité de la barrière intestinale (Tableau 3). Cela ouvre donc de nouvelles perspectives cliniques, diagnostiques mais aussi thérapeutiques intéressantes.

Tableau 3: Principales fonctions biologiques impactées par les mutations géniques dans les MICI (D'après Kökten et al., 2016)

Fonctions biologiques	RCH	MC	RCH et MC
Barrière épithéliale	<i>GNA12, HNF4A, CDH1, ERFF1</i>	<i>MUC19, ITLN1</i>	
Recrutement cellule immunitaire	<i>IL8RA, IL8RB</i>	<i>CCL11, CCL2, CCL7, CCL8, CCR6</i>	<i>MST1</i>
Présentation antigénique		<i>ERAP2, LNPEP, DENND1B</i>	
Voie Th17	<i>IL21</i>	<i>STAT3</i>	<i>IL23R, JAK2, TYK2, ICOSLG, TNFSF15</i>
Régulation LT	<i>IL2, IL7R, PIM3, TNFRSF9, TNFSF8, IFNG</i>	<i>NDFIP1, TAGAP, IL2R</i>	<i>TNFSF8, IL12B, IL23, PRDM1, ICOSLG</i>
Régulation LB	<i>IL7R, IRF5</i>	<i>IL5, IKZF1, BACH2</i>	
Tolérance immunitaire	<i>IL1R1, IL1R2</i>	<i>IL27, SBNO2, NOD2</i>	<i>IL10, CREM</i>
Autophagie	<i>DAP, PARK7</i>	<i>ATG16L1, IRGM, NOD2, LRRK2</i>	<i>CUL2</i>
Apoptose/Nécrose	<i>DAP</i>	<i>FASLG, THADA</i>	<i>PUS10, MST1</i>
Stress oxydative	<i>HSPA6, DLD, PARK7</i>	<i>PRDX5, BACH2, ADO, GPX4, GPX1, SLC22A4, LRRK2, NOD2</i>	<i>CARD9, UTS2, PEX13</i>
Stress du RE	<i>SERINC3</i>	<i>CPEB4</i>	<i>ORMDL3, XBP1</i>
Migration cellulaire	<i>ARPC2, LSP1, AAMP</i>		

(2) *Facteurs environnementaux*

La susceptibilité génétique ne peut à elle seule expliquer la survenue des MICI. En effet, le taux de concordance chez des jumeaux monozygotes n'étant pas de 100%, ce dernier souligne l'implication d'autres facteurs dans le développement des MICI.

Comme pour la composante génétique, l'implication de facteurs environnementaux émerge des données épidémiologiques. En effet, la prévalence plus importante de ces pathologies dans les pays industrialisés ainsi que l'augmentation de l'incidence dans les pays en voie d'occidentalisation suggère fortement une composante environnementale.

Les facteurs environnementaux semblent nombreux. Sont notamment cités le tabac, l'appendicectomie, la prise de contraceptifs oraux, les habitudes alimentaires, le stress, la pollution, la prise d'antibiotiques...etc. Parmi ces derniers, seuls l'effet du tabac et l'appendicectomie sont clairement établis. Celui du tabagisme est l'un des plus étudié. Il présente un effet opposé et non expliqué sur la RCH et la MC, protecteur dans la RCH et délétère dans la MC (Cosnes, 2008). En ce qui concerne l'appendicectomie, elle réduirait de près de 70% le risque de RCH si l'intervention est réalisée avant l'âge de 20 ans (Andersson et al., 2001). Le mécanisme de protection de l'appendicectomie contre la RCH reste inconnu. En revanche, dans la MC, même si cet effet reste discuté, l'appendicectomie pourrait augmenter le risque de MC (Russel et al., 1997).

L'importance de la vitamine D dans le métabolisme osseux est établie de longue date mais il existe actuellement un regain d'intérêt pour cette vitamine en raison de son éventuel rôle immunologique bénéfique dans diverses pathologies et notamment dans les MICI (Garg et al., 2012). Il a été montré qu'une carence en Vitamine D semble contribuer à un risque accru de développer une MICI et est plus fréquente chez ces patients (Leslie et al., 2008). Enfin, il a été montré que l'utilisation d'antibiotiques influence le risque de MICI par son effet sur le microbiote, l'utilisation d'antibiotiques au cours de la première année de vie étant plus fréquente chez les enfants atteints de MICI que chez les témoins (Shaw et al., 2010).

(3) *Facteurs microbiens*

Le microbiote intestinal est composé de 4 *phyla* bactériens majoritaires : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*.

Au-delà des facteurs génétiques et environnementaux, plusieurs arguments sont également en faveur de la contribution d'un déséquilibre de la flore intestinale appelé dysbiose intestinale dans le développement des MICI. Bien qu'il ne soit possible de cultiver que de l'ordre de 20 à 30% du microbiote intestinal, une modification et une instabilité de la composition de la flore dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI a été décrite, avec une augmentation de la concentration bactérienne dans l'intestin et présence en excès de bactéries potentiellement pathogènes telles que *Escherichia Coli*, *Listeria Monocytogenes* ou encore *Yersinia enterocolitica* (Andoh et al., 2011). Par conséquent, la proportion de bactéries dites « bénéfiques » du *phylum Firmicutes* (dont le groupe *Clostridium leptum* comprenant *Faecalibacterium prausnitzii*) est diminuée et une diminution de leur biodiversité est décrite (Martinez et al., 2008; Sokol et al., 2008a).

Certaines souches d'*Escherichia Coli* avec un phénotype adhérent et invasif sont décrites comme favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Glasser et al., 2001). A l'inverse, certaines bactéries dites « protectrices » comme *Faecalibacterium prausnitzii* inhibent leur production et favorisent celle des cytokines anti-inflammatoires. Une dysbiose intestinale pourrait ainsi être l'un des éléments de l'immunopathogénèse des MICI (Sokol et al., 2008b). De plus, des études sur modèles animaux montrant le développement d'une colite chez des souris sauvages *via* le transfert de microbiote suggèrent l'existence d'un microbiote « colitogénique » (Kim et al., 2005; Sartor, 2009, 2009). Enfin, comme évoqué précédemment, les variants génétiques de susceptibilité associés aux MICI touchent des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée et acquise contre les agents bactériens et des anticorps dirigés contre des composants microbiens comme les ASCA (Anti *Saccharomyces cerevisiae*) utilisés pour le diagnostic sont retrouvés chez les patients atteints de MC.

La dysbiose intestinale est également associée à un risque de rechute accru dans la MC après l'arrêt d'un traitement par l'anti-TNF (Louis et al., 2012). Cette dysbiose est même décrite comme une signature microbienne du statut inflammatoire de l'intestin, actuel (poussée) ou passé (rémission), le microbiote des patients en rémission étant proche de celui de patients

sains (West et al., 2015). Au regard de ces données, la greffe de microbiote fécale apparaît aujourd'hui comme une alternative thérapeutique intéressante dans les MICI (Gerding et al., 2015).

L'étiologie des MICI est donc multifactorielle (Figure 7). Les études cliniques et épidémiologiques mettent en évidence l'implication de facteurs environnementaux, de facteurs génétiques et de facteurs infectieux entraînant une hyperactivation du système immunitaire. Les interactions entre ces multiples facteurs restent encore mal connues. Une dérégulation de la barrière intestinale est incriminée également dans la pathogénie des MICI. L'intégrité de la BEI est assurée par les interactions entre les cellules épithéliales intestinales (CEI) et son microenvironnement direct tels que les cellules mésenchymateuses, les cellules immunitaires ou encore le microbiote intestinal. Plusieurs travaux soulignent également le rôle du SNE comme un acteur clé dans l'homéostasie de la BEI et donc dans ces dysfonctionnements. Le SNE et la BEI forment une unité fonctionnelle appelée l'UNGE. Le fonctionnement de l'UNGE est probablement modifié lors de pathologies intestinales et l'hypothèse de l'implication du SNE dans la physiopathologie des MICI n'est pas exclue. En effet, si le SNE a tout d'abord été considéré comme une cible de l'inflammation, un concept émergent voudrait que les composants du SNE participent directement à la réponse inflammatoire.

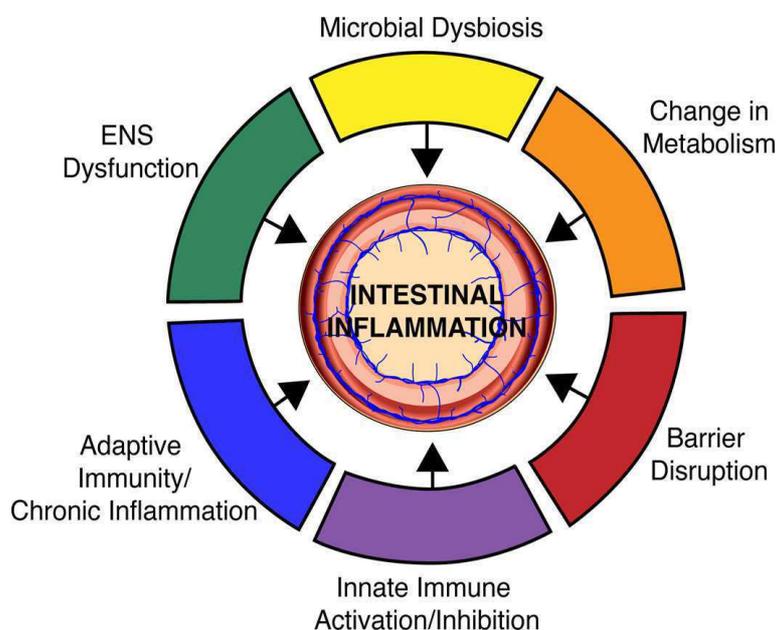


Figure 7 : Facteurs impliqués dans l'inflammation intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. (D'après Wlodarska et al., 2015)

II. L'unité neuro-glio-épithéliale

L'UNGE est une unité fonctionnelle, pluricellulaire regroupant les CEI, les neurones et les CGE. Les neurones et les CGE constituent un réseau distribué le long du tube digestif, le SNE. Ce dernier intervient dans la régulation des fonctions et le contrôle de l'homéostasie de la BEI selon un mode paracrine lié à la sécrétion de médiateurs solubles et à la proximité des différents composants cellulaires (Neunlist et al., 2007) (Figure 8).

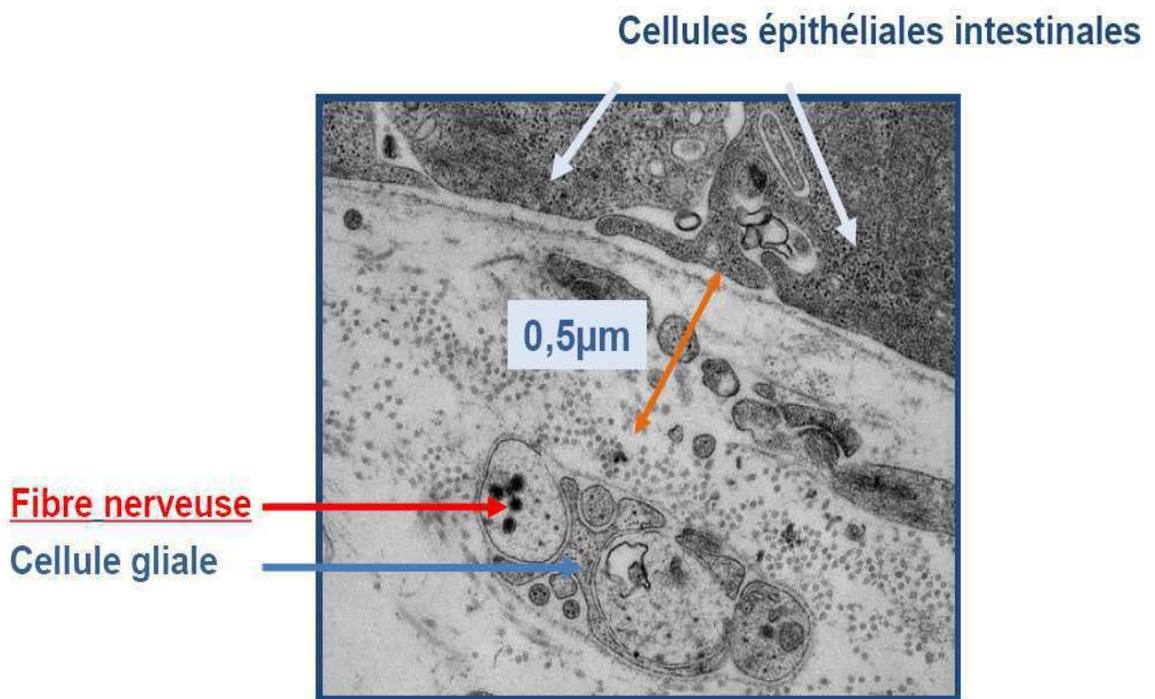


Figure 8: Image en microscopie électronique de l'Unité Neuro-Glio-Épithéliale. (D'après Neunlist et al., 2007)

a) La barrière épithéliale intestinale

La BEI est l'une des composantes de l'UNGE en relation avec les CGE et les neurones. Elle constitue un système d'échange entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. La BEI est formée d'une monocouche de CEI liées par des jonctions serrées et adhérentes tapisant l'ensemble du tube digestif. Le maintien de l'homéostasie de cette BEI est assuré par un équilibre entre les processus de prolifération, différenciation, migration, adhérence et exfoliation des CEI qui sont en relation entre elles par des interactions intercellulaires, et avec la matrice extracellulaire. Ces cellules épithéliales sont ainsi soumises à des signaux influençant les processus qui assurent l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BEI.

(1) Généralités

Le rôle principal de l'appareil digestif est d'absorber, d'assimiler les nutriments dans les circulations sanguine et lymphatique ainsi que d'éliminer les éléments non assimilables. Il s'étend de la bouche à l'anus, mesure environ 10 m et se compose de façon successive du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon se terminant par l'anus.

La paroi du tube digestif est composée de quatre tuniques concentriques successives (Figure 9) : la séreuse, la musculuse, la sous muqueuse et la muqueuse. La séreuse est la couche la plus externe et joue un rôle de protection. La musculuse, composée d'une couche externe de muscles lisses longitudinaux, d'un plexus nerveux et d'une couche interne de muscles lisses circulaires, assure la segmentation et le péristaltisme. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif lâche riche en capillaires sanguins et en follicules lymphatiques. Elle contient également un plexus nerveux. Enfin, la muqueuse est composée de trois couches successives. On retrouve de l'extérieur vers l'intérieur : la *muscularis mucosa* composée de deux couches fines de cellules musculaires lisses, la longitudinale externe et la circulaire interne ; la *lamina propria*, aussi appelée chorion, tissu conjonctif lâche, hébergeant des follicules lymphatiques et des neurones ; et la BEI, épithélium spécialisé à l'interface avec la lumière intestinale, constituée d'une monocouche de CEI.

Au niveau intestinal, une propriété de cet épithélium est sa capacité à se régénérer, tous les 4 à 5 jours, et notamment suite à des agressions provoquées par différents agents chimiques ou pathogènes. La régénération repose en grande partie sur la présence de cellules souches intestinales à fort potentiel prolifératif. Ces dernières prolifèrent activement et donnent naissance à des cellules progénitrices qui, après plusieurs cycles de divisions cellulaires, se différencient pour donner l'ensemble des cellules spécialisées de la BEI.

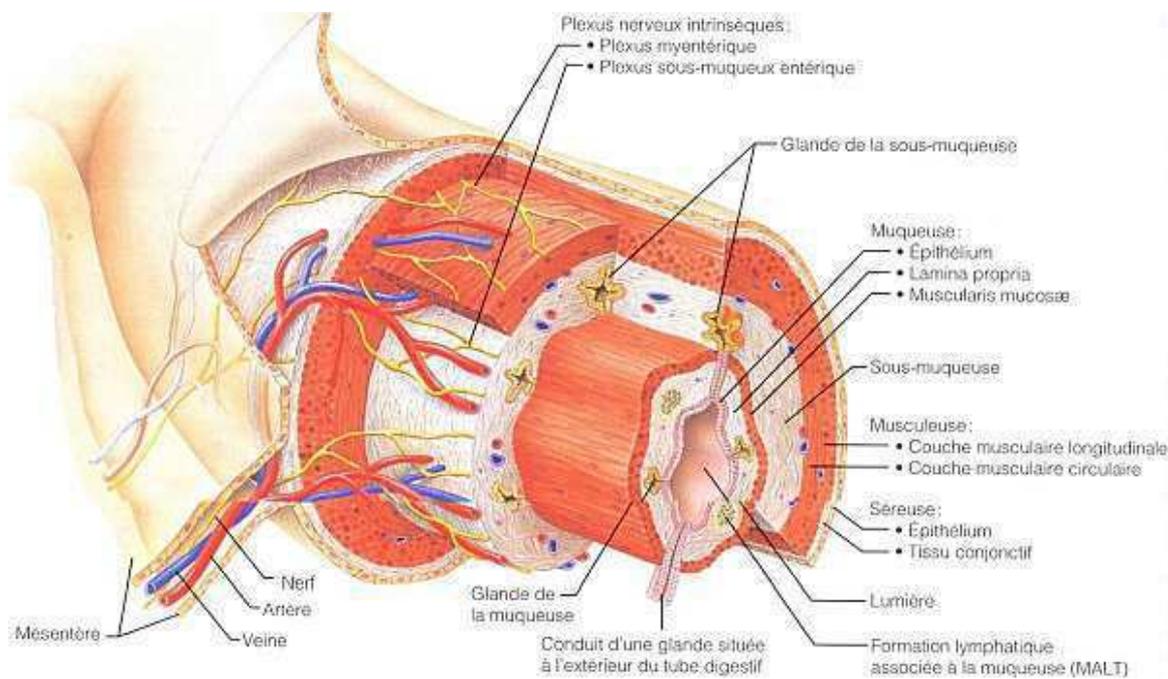


Figure 9: Représentation schématique de la paroi du tube digestif
(D'après Marieb E. N. Anatomie et physiologie humaines, Edition Pearson Education, 2005)

(2) Organisation de la BEI

(a) Cellules spécialisées de la BEI

Quatre grands types de cellules épithéliales spécialisées sont retrouvées au niveau de la BEI : absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes ou caliciformes à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (Figure 10). En plus de tous ces sous types

épithéliaux, il existe également les cellules Tuft et les cellules M ou « microfold ». Si les fonctions des cellules Tuft restent à être précisées, les cellules M sont quant à elles associées aux follicules lymphoïdes et sont spécialisées dans l'endocytose d'antigènes afin de les transporter de la lumière intestinale jusqu'au système immunitaire. Néanmoins, les cellules Tuft semblent exprimer les enzymes nécessaires à la synthèse de la PGD2 (Gerbe et al., 2012). Toutes ces cellules sont issues de la différenciation des cellules souches intestinales présentes au fond des cryptes.

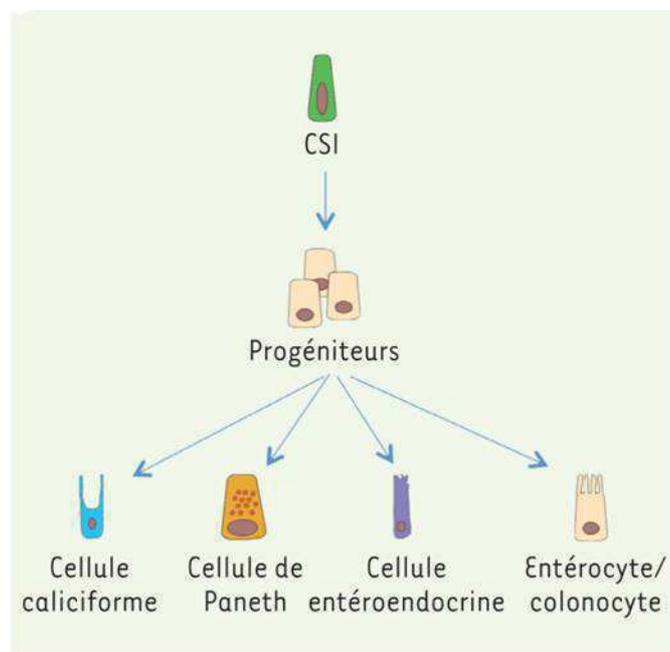


Figure 10: Cellules épithéliales intestinales spécialisées (D'après Stedman et al., 2016)

✓ Les entérocytes :

Les cellules absorbantes appelées entérocytes dans l'intestin grêle représentent plus de 80% des CEI. Elles sont situées le long des villosités et au sommet des cryptes. A leur pôle apical, elles présentent des microvillosités qui constituent la bordure en brosse. Ces villosités sont recouvertes du glycocalyx ayant principalement un rôle de protection de la BEI. Ces cellules assurent deux fonctions importantes du côlon : la réabsorption de l'eau et des électrolytes, et la digestion et l'absorption des produits alimentaires non dégradés au niveau de l'intestin

grêle. Elles sont également capables de produire des peptides anti-microbiens tels que les β -défensines (Kopp et al., 2015).

✓ Les cellules entéroendocrines :

Les cellules entéroendocrines représentent environ 1% du nombre total de CEI. On les retrouve tout le long de l'épithélium intestinal, de la muqueuse stomacale au rectum. Par contre, elles sont en nombre très faible au niveau du côlon et siègent essentiellement au fond des cryptes. Elles présentent à leur pôle basal des granules de sécrétions qu'elles libèrent dans la lumière intestinale, directement au niveau de la *lamina propria*. Dans l'intestin, il existe plusieurs sous-types de cellules entéroendocrines se différenciant par la nature des substances qu'elles libèrent. Ces substances vont intervenir par voie endocrine, paracrine, et autocrine dans la régulation de la motricité et des sécrétions digestives. Elles interviennent aussi dans la prolifération cellulaire et l'angiogénèse (Roda et al., 2010).

✓ Les cellules caliciformes :

Les cellules caliciformes ou mucosécrétantes sont comme les cellules entéroendocrines retrouvées tout le long de l'épithélium intestinal. Elles représentent environ 15 % des CEI. Leur nombre augmente du duodénum au côlon de façon proportionnelle au nombre de microorganismes présents de l'intestin grêle au côlon (van der Flier and Clevers, 2009). Elles renferment à leur pôle apical des granules intracytoplasmiques, les mucines, glycoprotéines protégeant la surface de l'épithélium intestinal. La principale mucine est MUC2. Les mucines peuvent être sécrétées dans la lumière ou être membranaires. Elles déterminent les propriétés rhéologiques du mucus qui recouvre la BEI. Les mucines membranaires ont également un rôle dans la signalisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Ce mucus joue un rôle de lubrificateur, protégeant l'épithélium du passage du bol alimentaire. Il protège aussi la muqueuse intestinale en jouant un rôle de barrière physique envers les potentiels pathogènes et les molécules de grandes tailles présentes dans la lumière telles que des toxines ou des protéases. Enfin, les cellules à mucus sécrètent un peptide (*trefoil factors*, TFF) qui interagit avec les mucines et participe à la formation du mucus.

✓ Les cellules de Paneth

Les cellules de paneth sont principalement localisées au fond des cryptes de l'intestin grêle alors qu'elles sont absentes de la muqueuse colique. Elles sécrètent des molécules antimicrobiennes comme les défensines ou le lysozyme dans la couche de mucus afin de concentrer l'activité bactéricide à proximité de l'épithélium et ainsi maintenir la stérilité des cryptes intestinales (Meyer-Hoffert et al., 2008).

(b) Organisation moléculaire

L'organisation de la BEI repose sur le fait que les CEI interagissent avec les cellules voisines et avec la lame basale de la matrice extracellulaire sur laquelle elle repose. On retrouve deux types d'interactions : les interactions de type cellule-cellule et les interactions cellule-matrice. Elles sont médiées par des complexes protéiques qui relient les cytosquelettes de deux CEI entre elles ou avec les composants de la matrice.

✓ Interactions cellule-cellule

Il existe quatre types de complexes reliant les CEI voisines entre elles : les jonctions serrées, les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (GAP junctions) (Neunlist et al., 2013) (Figure 11).

Les jonctions serrées sont des complexes protéiques retrouvés au pôle apical de la BEI. Elles associent des protéines transmembranaires formant le pore de la jonction et des protéines cytoplasmiques formant une plaque protéique connectée au cytosquelette d'actine. Elles jouent un rôle dans la polarité cellulaire et dans la régulation de la perméabilité intestinale. Parmi les protéines transmembranaires les plus connues, on retrouve les membres de la famille des claudines, l'occludine et la protéine JAM (*Junction Adhesion Molecule*). Les protéines cytoplasmiques assurant la jonction entre les protéines transmembranaires et l'actine sont les *zonula occludens* (ZO) et la cinguline (Förster, 2008). La taille des pores formés par les jonctions serrées définit la perméabilité paracellulaire. Le passage sélectif entre les cellules épithé-

liales intestinales de molécules est fonction de leur taille et de leur charge (Tsukita et al., 2001).

Les jonctions adhérentes situées immédiatement en dessous des jonctions serrées, au pôle basolatéral, forment une ceinture continue de contacts intercellulaires. Elles reposent sur des liaisons homophiliques calcium-dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-Cadhérine.

Les desmosomes sont constitués de plusieurs protéines transmembranaires reliées par la desmoplakine aux filaments intermédiaires du cytosquelette. Ils confèrent à la BEI une force mécanique lui permettant de résister aux forces de pression exercées pendant le péristaltisme (Garrod et al., 2002).

Enfin, les jonctions communicantes ou gap junctions forment des canaux qui permettent aux signaux électriques et chimiques de passer d'une cellule à l'autre.

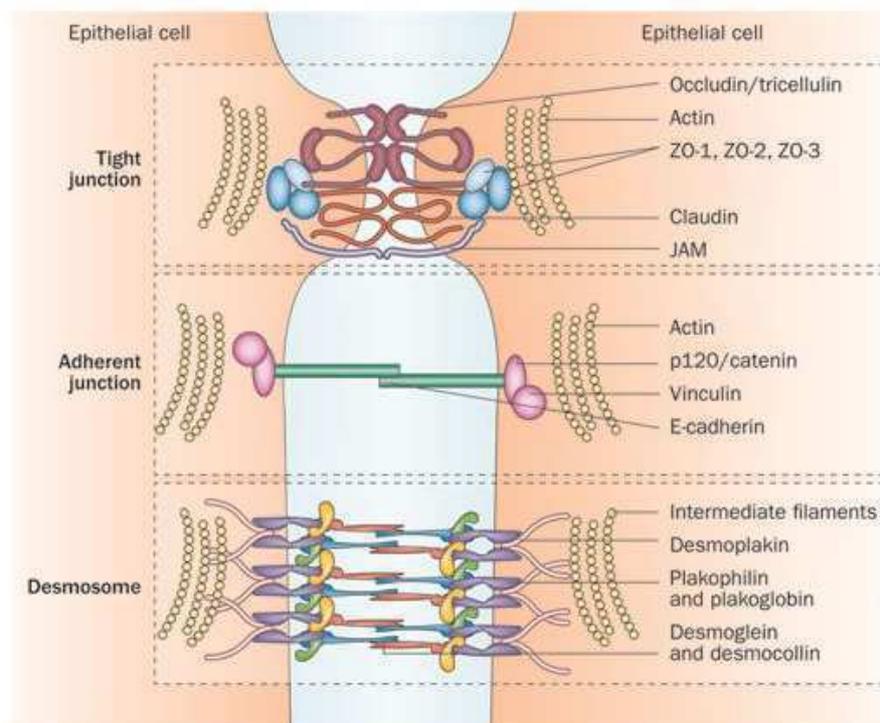


Figure 11: Les complexes d'adhésion régulant les interactions entre les cellules épithéliales intestinales. (D'après Neunlist et al., 2013)

✓ Interactions cellule/matrice

Il existe deux types de jonctions entre les CEI et la matrice extracellulaire de la lame basale *via* des intégrines: les adhésions focales et les hémidesmosomes.

(3) *L'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale*

Le maintien de l'homéostasie de la BEI est assuré par un équilibre entre la prolifération et l'exfoliation des CEI ainsi que la capacité réparatrice de la BEI. C'est une structure complexe et dynamique en perpétuel renouvellement. Elle est entièrement renouvelée en 3 à 5 jours, ce qui correspond à la production d'environ dix milliards de cellules nouvelles chaque jour. Cela permet également de protéger l'organisme en éliminant les cellules infectées ou endommagées (Wells et al., 2017). Cette capacité de régénération repose en grande partie sur la présence de cellules souches intestinales (CSI) à fort potentiel prolifératif. Ces dernières résident au fond des cryptes intestinales et se caractérisent notamment par l'expression du gène *Lgr5* (*leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*) (Clevers, 2013). Les CSI émergent des cryptes et migrent le long de l'axe des villosités où elles cessent de proliférer et acquièrent des fonctions différenciées pour donner l'ensemble des cellules spécialisées de la BEI (Figure 12). A l'exception des cellules de Paneth qui restent confinées à la base des cryptes de l'intestin grêle, les cellules épithéliales s'arrêtent de proliférer et se différencient en atteignant le haut des cryptes, puis elles migrent le long des villosités de l'intestin grêle ou à la surface des coiffes épithéliales du côlon. Au sommet des villosités, elles sont exfoliées dans la lumière intestinale. Ce renouvellement résulte d'une régulation coordonnée de la prolifération, la différenciation et l'exfoliation des cellules mortes. En effet, les CEI sont soumises à différents signaux émanant de leur environnement et influençant les processus qui assurent l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BEI (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017). Dans ce sens, la voie de signalisation WNT ou voie de la β -caténine est particulièrement impliquée. Elle intervient dans la prolifération, la différenciation et le maintien des cellules souches intestinales au fond des cryptes. D'autres voies intervenant dans la migration et la différenciation des CEI comme les voies Notch, BMP hedgehog et hippo ont également été décrites (Clevers et al., 2014). Enfin, de nombreux facteurs dont les facteurs de croissance ont

également été décrits comme intervenant dans la réparation de la BEI suite à des agressions responsables d'une rupture de continuité de cette dernière. Le processus de réparation de la BEI peut être résumé en 3 étapes : réparation de la muqueuse ou restitution épithéliale, différenciation et régénération (Taupin and Podolsky, 2003). A noter que la première étape de restitution épithéliale consiste en la migration et l'étalement des cellules viables entourant la zone lésée pour aboutir à un rétablissement rapide de la continuité de la BEI (Lacy, 1988)

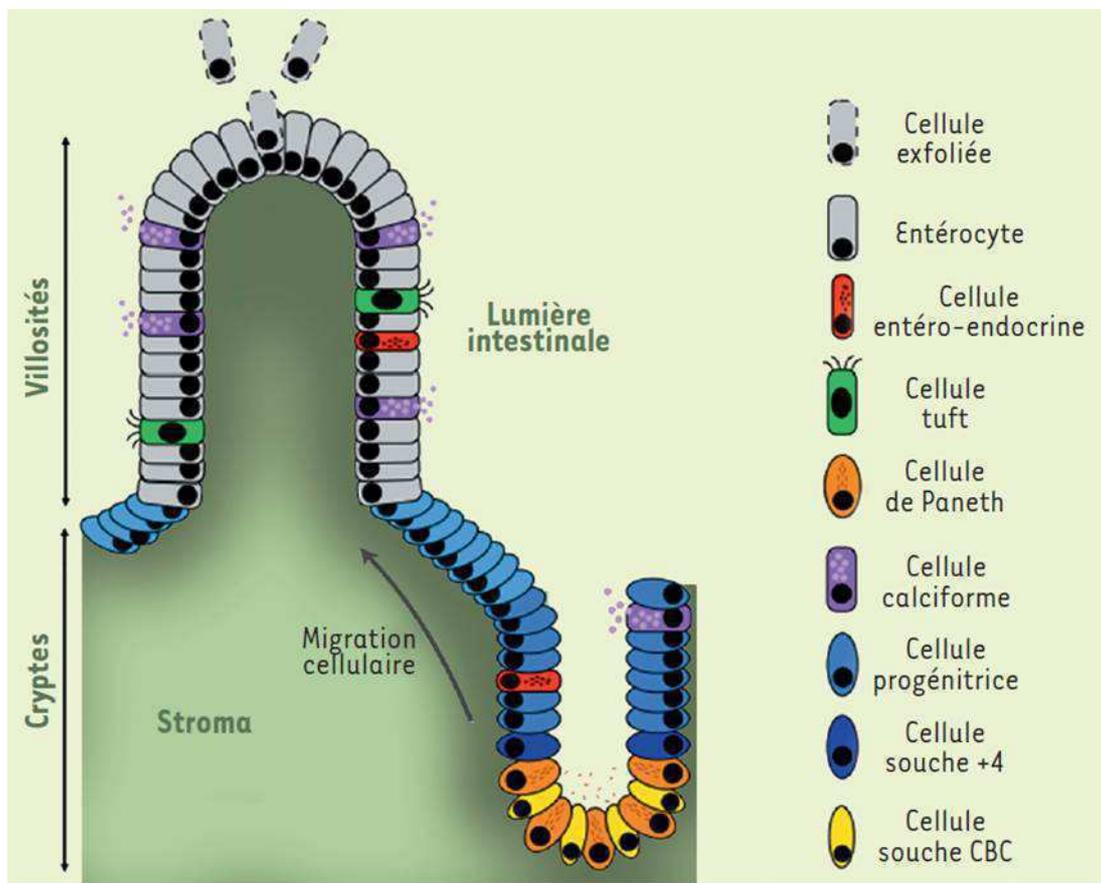


Figure 12: Structure de l'épithélium intestinale (D'après Quesada and Jay, 2016)

(4) *Fonctions de la barrière épithéliale intestinale*

Si la BEI a pour rôle de permettre l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes, elle joue également à la fois le rôle de barrière écologique, physique, chimique et immunitaire. De façon schématique, elle est constituée d'un biofilm bactérien, d'une couche de mucus, et de l'épithélium intestinal comprenant les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, cellules de paneth, macrophages et neutrophiles). Chacun de ces éléments participe aux différentes lignes de défense de la BEI contre les agressions (Figure 13).

La barrière écologique constituée des bactéries commensales qui peuplent notre TD constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes en empêchant la colonisation de la muqueuse intestinale par les bactéries pathogènes. S'en suit, une première barrière physique contre les agents pathogènes assurée par la sécrétion de mucus issu des cellules caliciformes. Le gel de mucus exerce un rôle de filtre limitant la pénétration des molécules et des micro-organismes en fonction de leur charge et de leur taille. Il joue aussi un rôle de barrière chimique car on y trouve des peptides antibactériens sécrétés par les cellules de paneth et des immunoglobulines A provenant des plasmocytes intra-épithéliaux. La deuxième barrière physique repose sur l'organisation structurale de la BEI et notamment les interactions cellule-cellule et cellule matrice déjà décrites.

La BEI est également un acteur important de l'immunité innée et adaptative. Les CEI sont capables de recevoir des signaux et de les intégrer afin de permettre la communication bactéries-hôte. En effet, les CEI expriment des PRR (*pattern-recognition receptors*) représentés par les TLR et les NOD qui reconnaissent des motifs moléculaires associées aux pathogènes. Elles s'activent alors pour produire les peptides antibactériens (β défensines, Lysozyme), synthétiser des cytokines nécessaires aux réponses inflammatoires et expriment des molécules du CMH afin d'amorcer la réponse adaptative (Fukata and Arditi, 2013). La sécrétion d'agents antimicrobiens comme le lysozyme ou les défensines protège de l'invasion bactérienne et permet la lyse de la membrane des micro-organismes (Vaishnava et al., 2008). Leur sécrétion est soit constitutive, soit induite en condition inflammatoire par le LPS ou encore le TNF α et IL1 β . Enfin, les cellules M, associées aux follicules lymphoïdes participent aussi aux défenses immunitaires de la BEI en transportant les antigènes de la lumière intestinale jusqu'au sys-

tème immunitaire par endocytose. Il en résulte une activation des cellules dendritiques locales et ainsi la mise en place de la réponse immunitaire, conduisant à la production d'immunoglobulines spécifiques des antigènes par les lymphocytes B (Wang et al., 2014).

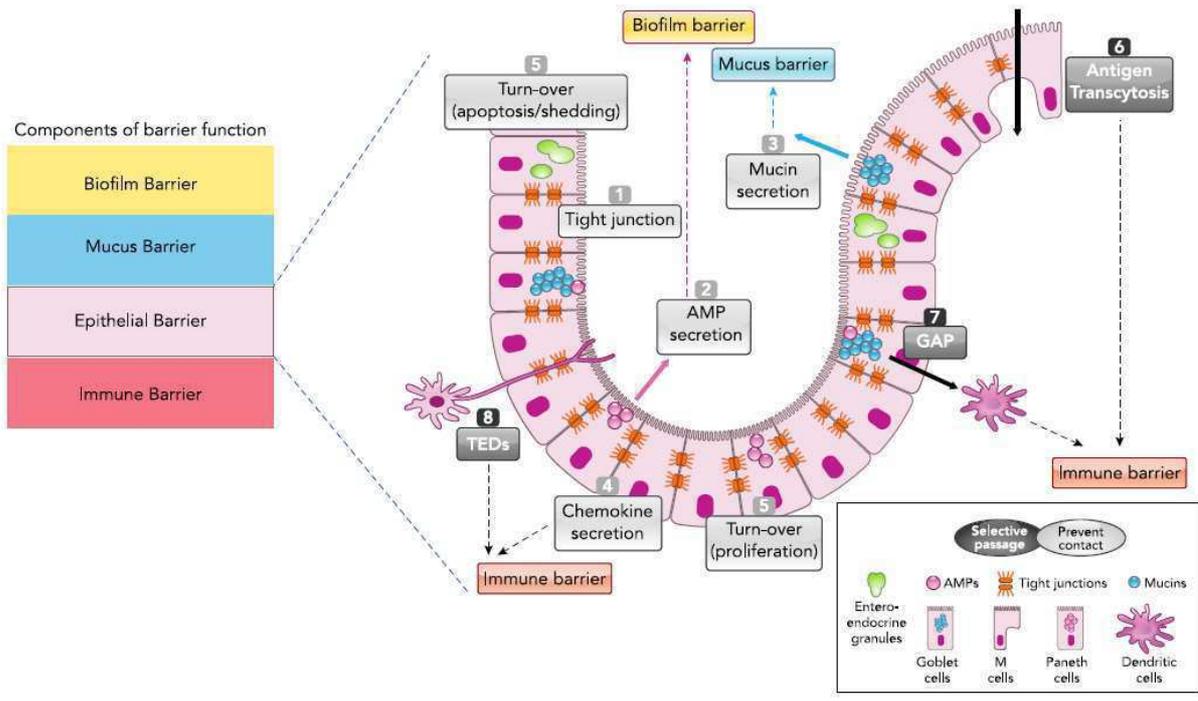


Figure 13: Les différentes lignes de défense de la barrière épithéliale intestinale (D'après Vergnolle and Cirillo, 2018)

(5) Altérations de la BEI dans les MICI

A l'heure actuelle, les mécanismes de déclenchement de l'inflammation et d'amplification de cet état, responsables des lésions organiques dans les MICI, restent à être définis. Chaque ligne de défense de la BEI est altérée (Figure 14).

Les données actuelles permettent de suggérer qu'il existe une relative « immunodépression » de la barrière intestinale dans la MC (Khor et al., 2011; Nalle and Turner, 2015). En effet, une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal a été rapportée dans les MICI (Schmitz et al., 1999). Cette dysfonction semble précoce et antérieure aux atteintes inflamma-

toires. Elle est probablement l'un des éléments clé de la pathologie et causée par les facteurs environnementaux, microbiens et génétiques précédemment cités (Khor et al., 2011). En effet, la BEI affaiblie va alors conduire au passage de nombreux micro-organismes, ions, et autres molécules participant ainsi à la génération et à l'entretien de l'état inflammatoire et des diarrhées caractéristiques des MICI (Schmitz et al., 1999).

Cette altération de la BEI semble être précédée par la dégradation de la barrière de mucus qu'elle produit, première barrière protectrice de l'intestin. En effet, dans la RCH, une altération de la couche de mucus a été observée et notamment une diminution de l'expression de MUC2 (Tytgat et al., 1996). Des études ont ainsi mis en évidence que des souris invalidées génétiquement pour MUC2 développent de façon spontanée une colite (Lu et al., 2011). Ces données consolident la participation des mucines dans la physiopathologie des MICI. Les mucines MUC5AC et MUC2 seraient ainsi impliquées dans la réparation épithéliale au cours des MICI en agissant sur la différenciation et la croissance cellulaire (Buisine et al., 2001; Velcich et al., 2002).

L'augmentation de la perméabilité para-cellulaire de la BEI dans les MICI est également liée à des altérations des jonctions serrées des entérocytes (Kamada et al., 2013). Elle concerne le passage de molécule depuis le pôle apicale jusqu'au pôle basolatérale entre deux CEI grâce à la dilatation de jonction serrées. Ces dernières sont causées par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ ou le TNF α connues pour participer à la rupture de l'intégrité de la barrière (Wang et al., 2005b). Ces cytokines inflammatoires compromettent l'intégrité de la muqueuse intestinale notamment par l'augmentation de l'activité de la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) (Al-Sadi et al., 2013). Un défaut fonctionnel de la muqueuse épithéliale constituée par les peptides antimicrobiens a également été mis en évidence dans les MICI (Ramasundara et al., 2009).

Enfin, le renouvellement de la BEI par l'apoptose des CEI, indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale semble dérégulé au cours des MICI (Günther et al., 2013). Un nombre supérieur de corps apoptotiques a été retrouvé dans les biopsies coliques de patients présentant une RCH par rapport à des sujets sains (Hagiwara et al., 2002).

La dégradation de la couche de mucus, l'altérations des jonctions serrées et l'altération des cellules épithéliales contribuent à une exposition excessive de la BEI aux antigènes de la flore commensale et l'expose de façon prolongée aux bactéries pathogènes qui envahissent la *lami-*

na propria (Kamada et al., 2013). Cela va faciliter l'activation du système immunitaire muqueux et la réponse est amplifiée par le recrutement des cellules effectrices au site de l'inflammation. Les défenses innées se mettent en place avec la contribution des peptides antimicrobiens puis celle des PRR.

D'un point de vue mécanistique, cette activation excessive de la réponse immunitaire se traduit par une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires synthétisées par les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les macrophages comme l'IL1- β , IL6 et l'IL8 ou encore de la PGE2. Les cellules dendritiques sont à l'interface entre les CEI et les lymphocytes T. Sous l'effet des cytokines et de leur activation *via* leurs récepteurs TLR et NOD2, les cellules dendritiques des plaques de Peyer et de la *lamina propria* vont migrer vers les ganglions mésentériques et s'activer. Par la suite, les cellules dendritiques matures sécrètent de l'IL12 et de l'IL23 favorisant les réponses immunitaires de type TH1, TH2 et TH17 et amorçant une inflammation locale persistante (Baumgart and Carding, 2007). Au final, les lymphocytes T activés vont sécréter à leur tour des cytokines comme l'IFN γ amplifiant l'altération de la BEI (Mowat, 2003).

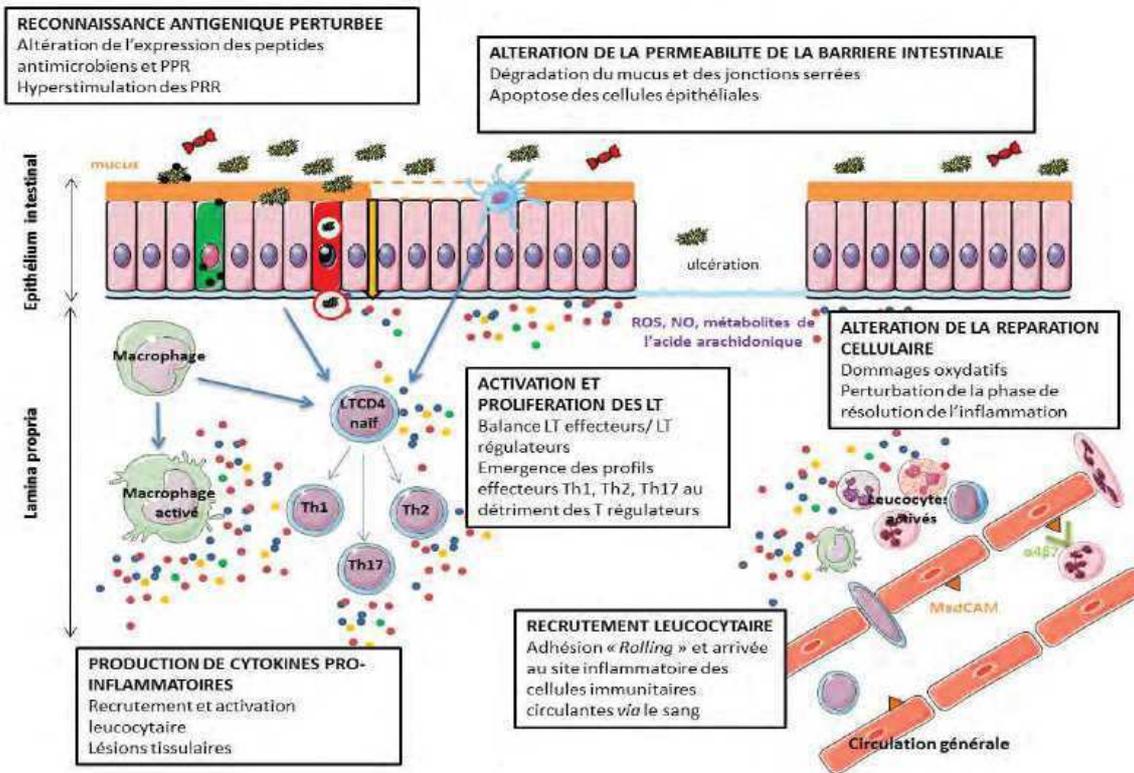


Figure 14: Etat des lieux de la physiopathologie des MICI

(LT : Lymphocyte T ; LTh : Lymphocyte T helper, PNB: polynucléaire basophile; PNE: polynucléaire éosino-phile; PNN: polynucléaire neutrophile; PRR: pathogen recognition receptor ; ROS : radicaux oxygénés ; NO : oxyde nitrique Extrait de la thèse de J Legendre, «microbiote intestinal et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin », 2000)

Au final, 3 évènements majeurs semblent intervenir dans la physiopathologie des MICI :

- une altération de la BEI,
- une stimulation excessive des cellules de l'immunité intestinale par les antigènes luminaux,
- une réponse immunitaire inappropriée.

b) Le système nerveux entérique

(1) Généralités

Le SNE est un réseau ganglionnaire composé de 400 à 600 millions de neurones entériques et 5 à 10 fois plus de CGE. Il est présent dans la paroi du TD du tiers inférieur de l'œsophage jusqu'au rectum ainsi que dans les glandes associées (glandes salivaires, pancréas et vésicule biliaire (Furness, 2012; Hansen, 2003). Dès 1857, G. Meissner et L. Auerbach décrivaient la présence de neurones dans la paroi intestinale. Depuis leur classification en fonction de leurs formes et projections ainsi que l'expression des neurotransmetteurs, le rôle des neurones entériques dans la fonction de motricité du TD a été largement décrit (Furness, 2000). A l'inverse, les fonctions du second contingent cellulaire, constitué par les cellules gliales, sont largement moins connues.

Le SNE contrôle un grand nombre de fonctions intestinales telles que la motricité digestive, l'absorption, la sécrétion, la perméabilité, la réparation, la prolifération et la différenciation cellulaires, le flux sanguin et les fonctions immunitaires (Goyal and Hirano, 1996; Neunlist et al., 2013; Vergnolle and Cirillo, 2018). Il exerce ses fonctions de façon autonome vis à vis du SNC. Néanmoins, le SNC exerce un rôle sur l'activité neuronale du SNE et donc sur les fonctions gastro-intestinales (Furness, 2012).

Il est organisé en 2 plexus majeurs, le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux, organisés à leur tour en ganglions et reliés entre eux par des fibres interganglionnaires (Figure 15). Ces 2 plexus se différencient par leur localisation anatomique, leurs fonctions, leur densité neuronale (plus faible dans le plexus myentérique) ainsi que par leur codage neurochimique.

Le plexus myentérique (Auerbach) est localisé entre la couche musculaire longitudinale et la couche musculaire circulaire, depuis l'œsophage jusqu'au rectum. Les études anatomiques et fonctionnelles ont montré qu'il régule plutôt les fonctions motrices intestinales (Furness, 2012; Hansen, 2003).

Le plexus sous muqueux est localisé dans la couche sous muqueuse, entre la muqueuse et la couche musculaire lisse circulaire. Il est organisé en plusieurs réseaux présents seulement

dans l'intestin grêle et le côlon. Le plexus principal est le plexus de Meissner situé sous la muqueuse (Rühl, 2005; Wedel et al., 1999). D'autres plexus dépourvus de structures ganglionnaires sont retrouvés dans les différentes couches de la paroi digestive. Il est admis que le plexus sous muqueux est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI (Furness, 2012). La BEI est en effet innervée par un grand nombre de fibres nerveuses qui proviennent des ganglions sous muqueux. Ces fibres forment un réseau très dense entourant les villosités intestinales et peuvent libérer des neurotransmetteurs à proximité de la BEI (Neunlist et al., 2007a).

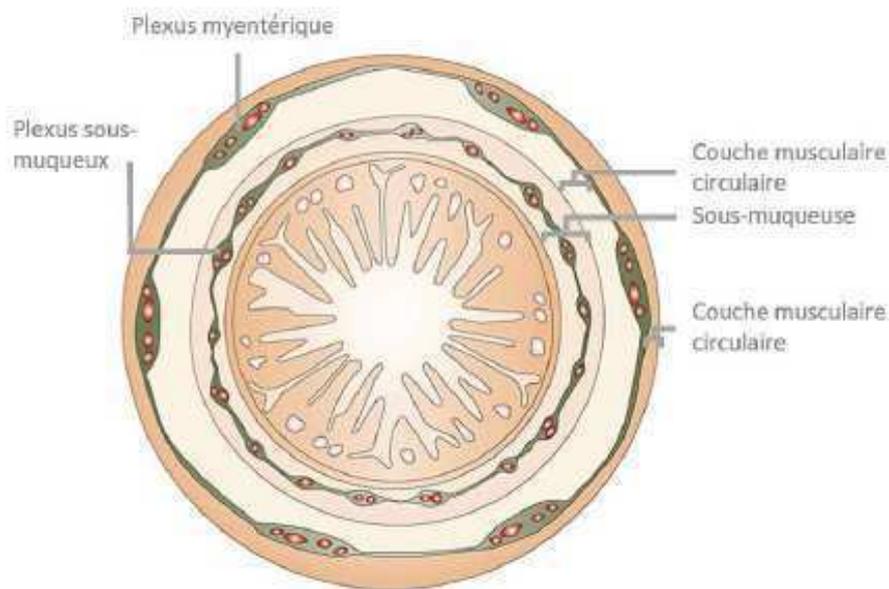


Figure 15: Représentation schématique des deux plexi ganglionnaires principaux du SNE sur coupe transversale d'intestin grêle (D'après Heanue and Pachnis, 2007)

Le SNE communique avec le SNC par l'intermédiaire d'afférences et d'efférences du système nerveux autonome. Les informations transmises au SNC sont relayées par le système parasympathique du nerf vague et le système sympathique des nerfs splanchniques (Wood, 1999).

(2) *Les neurones entériques*

(a) **Classification et caractéristiques des neurones entériques**

Plusieurs classifications ont été proposées pour différencier les neurones entériques. Selon la classification morphologique de Dogiel, basée sur les différentes formes et longueurs de leurs dendrites, il existe trois types de neurones I, II, III (Figure 16). Quatre autres types neuronaux ont par la suite été identifiés (classés de IV à VII) mais la majorité des neurones entériques appartiennent aux types I, II et III (Hansen, 2003).

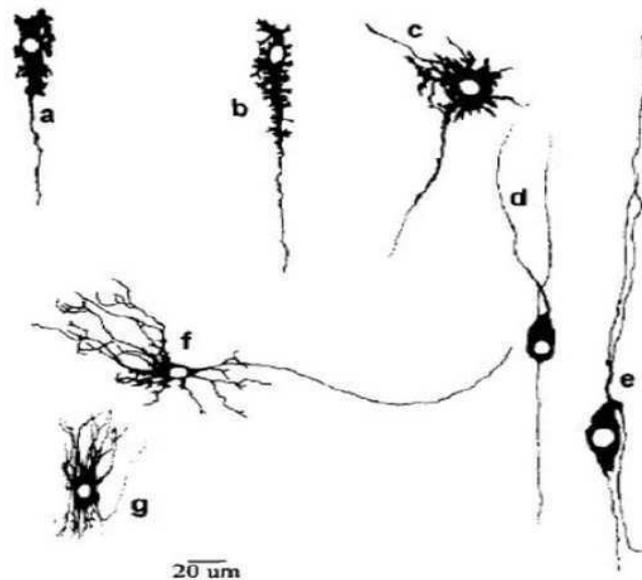


Figure 16: Classification de Dogiel des neurones entériques
(D'après Timmermans et al., 1997)

(Les principaux types morphologiques de neurones entériques de l'intestin grêle chez le cobaye sont : (a-c) les neurones de type I, uniaxonaux multidendritiques (dendrites courtes et lamellaires), (d-e) les neurones de type II, adendritiques multiaxonaux, (f) les neurones de type III, uniaxonaux et multidendritiques (dendrites longues), et (g) les neurones filamenteux)

Les neurones entériques peuvent être également classés en trois groupes selon leurs fonctions (Figure 17), à savoir : les neurones afférents primaires intrinsèques ou IPANs, les neurones moteurs et les interneurones. Les IPANs représentent environ 20 % des neurones entériques. Ils jouent un rôle dans la détection de variations de l'environnement digestif et les transmettent à des voies réflexes. Leur rôle est donc déterminant dans le contrôle et la régulation de l'état fonctionnel du TD et de ses réponses aux différents stimuli chimiques ou mécaniques (Furness et al., 1998). Les neurones moteurs peuvent quant à eux encore être divisés en cinq types (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, 2000). Leur rôle est de transmettre l'information aux cellules effectrices par l'intermédiaire notamment de neurotransmetteurs. Le dernier groupe, les interneurones, qui représentent la majorité des neurones entériques ont pour rôle d'intégrer et de relayer l'information entre les neurones afférents et les neurones moteurs.

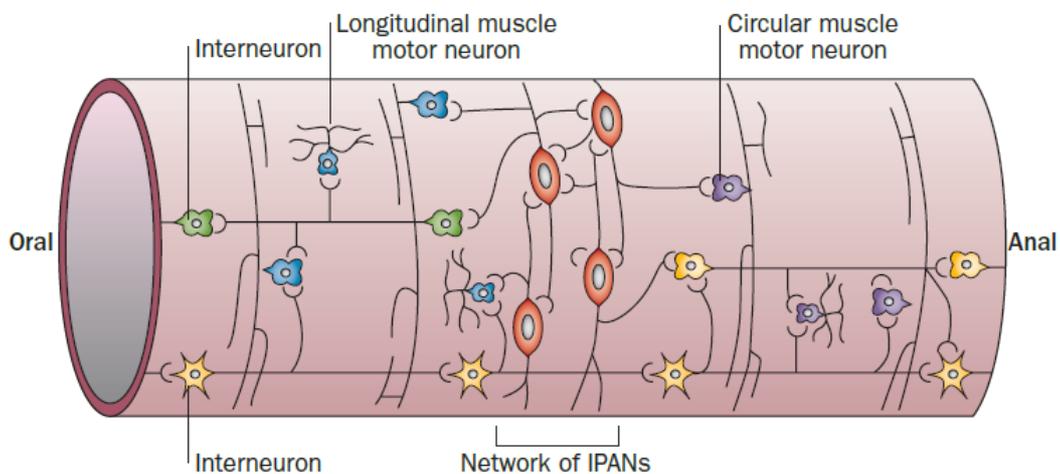


Figure 17; Les différents types de neurones selon leurs fonctions (D'après Furness, 2012)

(Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN) apparaissent en rouge, les interneurones descendants sont en jaune et les ascendants en vert. Les neurones moteurs excitateurs sont en bleu et les inhibiteurs en violet)

Enfin, les neurones peuvent être classés selon leurs phénotypes neurochimiques. En effet, ils communiquent entre eux et avec leurs effecteurs, tels que les cellules musculaires lisses *via* la synthèse et la sécrétion de substances chimiques ou neuromédiateurs. Plus de trente ont été

identifiés et chaque neurone entérique exprime de 1 à 11 médiateurs définissant son codage neurochimique (Schemann and Neunlist, 2004). Ces neuromédiateurs et autres substances produites par les neurones peuvent être classés selon leur action excitatrice ou inhibitrice sur les cellules cibles (Tableau 4). Il existe également une corrélation entre le codage neurochimique des neurones entériques et leurs fonctions (tableau 5) (Hansen, 2003).

Tableau 4: Diversité du codage neurochimique entérique selon leurs fonctions inhibitrices ou excitatrices sur les cellules cibles. (D'après Hansen, 2003)

Effet	Stimulation	Inhibition
Substances	Ach, ATP, 5-HT, Histamine, neurokinine A, SP, CCK, GRP, motiline, bombésine, opioïdes, TRH, PGE2	NO, VIP, SOM, GABA, CGRP, NPY, galanine, glucagon, neurotensine, PACAP, PHI, PYY, sérotonine, dopamine

ATP (Adénosine 5'-Triphosphate), CCK (CholeCystoKinine), CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), GABA (γ -Amino-Butyric Acid), GRP (Gastrin Releasing Peptide), NO (Nitric Oxyde), NPY (Neuropeptide Y), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), PGE2 (Prostaglandine E2), PHI (Peptide Histidine Iso-leucine), PYY (Peptide YY), SOM (Somatostatine), SP (Substance P), TRH (Thyrotropin Releasing Hormon), VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), 5-HT (ou sérotonine)

Tableau 5: Diversité du codage neurochimique des neurones entériques selon leurs fonctions physiologiques (D'après Hansen, 2003)

Fonction	Codage neurochimique
IPAN	Ach, Calbindine, CGRP, SP
Interneurones ascendants	Ach, Calrétinine, ENK, SP
Interneurones descendants	Ach, 5-HT, Dynorphine, GRP, NO, Somatostatine, VIP
Neurones moteurs excitateurs	Ach, Calrétinine, ENK, SP
Neurones moteurs inhibiteurs	Dynorphine, ENK, GRP, NO, VIP
Neurones sécrétomoteurs	Ach, CCK, CGRP, Dynorphine, NPY, Somatostatine, VIP

CCK (CholeCystoKinine), CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), ENK (Enképhaline), GRP (Gastrin Releasing Peptide), NO (Nitric Oxyde), NPY (NeuroPeptide Y), SP (Substance P), VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), 5-HT (sérotonine)

Les neurones du SNE ne présentent pas de marqueurs spécifiques. Ainsi, ce sont les mêmes marqueurs qui sont utilisés pour les neurones périphériques et centraux. On retrouve notamment le HuC/D (Lin et al., 2002), le NSE (*neuronal specific enolase*) (Neunlist et al., 2003a), et la Protein Gene Product (PGP) 9.5 (Krammer et al., 1994) comme marqueurs des corps cellulaires neuronaux.

(b) Rôle des neurones entériques

Un des rôles des neurones entériques est le contrôle des fonctions de la muqueuse gastro-intestinale par l'intermédiaire de différents neuromédiateurs (Vergnolle and Cirillo, 2018). Les neurones entériques sont impliqués dans le réflexe du péristaltisme. Le péristaltisme est un réflexe activant un circuit nerveux, aboutissant à une contraction du côté oral et une relaxation du côté anal. Il permet par sa répétition, la progression du bol alimentaire dans l'intestin. Il est activé par un stimulus mécanique ou chimique (modification du pH, changement d'osmolarité, présence de certains nutriments..). Ainsi, les différents stimuli vont activer les cellules endocrines de la muqueuse comme les cellules entéroendocrines. Celles-ci vont sécréter de la sérotonine (5-HT) et activer les IPAN qui vont ensuite transmettre l'information aux interneurons par l'intermédiaire de neurotransmetteurs (Furness, 2000). Les neurones entériques sont également impliqués dans le contrôle de la sécrétion intestinale. D'ailleurs, celle-ci peut être initiée par le réflexe de péristaltisme précédemment décrit. En exemple, le frottement ou la distension de la muqueuse active les neurones qui libèrent de l'acétylcholine (ACh) et du peptide vasoactif intestinal (VIP) (Neunlist et al., 1998). Ces deux neuromédiateurs activent ensuite la libération d'ions chlore dans la lumière digestive par les cellules épithéliales intestinales et inhibent l'absorption d'ions sodium (Bornstein et al., 2004).

Plusieurs travaux suggèrent que l'activation des neurones entériques conduit au renforcement de la BEI caractérisé par une diminution de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire. La composante paracellulaire permet un passage sélectif des molécules grâce aux jonctions serrées situées au niveau du pôle apical des CEI. La composante transcellulaire est responsable du transport de molécules de grande taille jusqu'à la *lamina propria* par des endosomes dans la CEI. Tout d'abord, il a été montré, sur modèle porcin, que la stimulation des racines sacrées

conduit à une diminution de la perméabilité paracellulaire intestinale (Meurette et al., 2012b). De plus, des travaux réalisés sur un modèle de coculture de plexus sous-muqueux humain et d'une monocouche de CEI soulignent aussi le rôle direct du SNE sur la régulation de la perméabilité de la BEI. La stimulation électrique du SNE entraîne une diminution de la perméabilité paracellulaire de la monocouche de CEI via l'augmentation de l'expression de la jonctions serrées ZO-1, et ce par un mécanisme dépendant de l'activation de voies VIPergiques (Neunlist et al., 2003b). D'autres neuromédiateurs comme l'Ach et la neurokinine A ou encore le neuropeptide Y sont connus également pour réguler la perméabilité de la BEI (Blais et al., 1997; Chandrasekharan et al., 2013; Hällgren et al., 1998).

D'autres travaux ont mis en évidence que les neurones entériques jouaient un rôle important dans le contrôle de la prolifération des CEI. De la même façon, sur modèle de coculture de plexus sous-muqueux humains et d'une monocouche de CEI, il a été montré que l'activation par stimulation électrique, *via* une voie VIPergique, favorise le maintien de l'organisation de la BEI et diminue la prolifération des CEI (Toumi et al., 2003, 2004).

D'une manière générale, les neurones régulant les fonctions motrices du tube digestif sont situés dans le plexus myentérique, et ceux impliqués dans le contrôle des fonctions de la BEI dans le plexus sous-muqueux (Neunlist et al., 2013).

Si les neurones entériques régulent les fonctions de perméabilité et de prolifération des CEI, les CEI ont un rôle de neuroprotection pour les neurones entériques soumis à un stress oxydatif (Moriez et al., 2009). La survie et les fonctions des neurones entériques sont aussi régulées par les facteurs nutritionnels présents dans le microenvironnement. Par exemple, l'alimentation peut conduire à des modifications neuronales. Dans ce sens, il a été montré que les acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate augmentent la proportion de neurones cholinergiques dans le plexus myentérique et sous muqueux du côlon distal chez le rat induisant un transit accéléré (Suply et al., 2012).

(3) Les cellules gliales entériques

(a) Caractéristiques et classification des cellules gliales entériques

Les CGE constituent un type cellulaire dérivé des cellules de la crête neurale. La première description des CGE dans l'intestin a été réalisée en 1899 par Dogiel. Il a décrit dans le SNE la présence de cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques, les CGE. Pendant des années, ces dernières ont été considérées comme simples éléments nutritifs ou de soutien des neurones entériques et leur rôle dans l'intestin a longtemps été peu étudié.

En effet, du fait de leurs propriétés et origines communes, les CGE ont d'abord été assimilées aux cellules de Schwann (Cabarrocas et al., 2003). En réalité, elles présentent des analogies avec les astrocytes du système nerveux central (SNC). D'ailleurs, elles expriment des marqueurs communs avec les astrocytes. En pratique, les marqueurs les plus utilisés pour identifier les CGE sont sox10, S100- β , et GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) coexprimés par la majorité d'entre elles (Boesmans et al., 2015). La GFAP, protéine exprimée par les filaments intermédiaires ou neurofilaments est spécifique des CGE. A l'heure actuelle, sa fonction est mal connue (Boesmans et al., 2015; von Boyen et al., 2004). La protéine S100- β est une protéine de la liaison au calcium localisée dans le cytoplasme des CGE. Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires. Par le maintien de l'homéostasie calcique, elle participe à la régulation du cytosquelette. Sox10 est un facteur de transcription impliqué notamment dans la différenciation des cellules gliales (Hoff et al., 2008).

Les CGE sont essentielles au maintien de l'homéostasie des fonctions neuronales via des interactions directes et paracrines. Elles sont retrouvées en grand nombre en périphérie des corps cellulaires et tout au long des fibres nerveuses (Neunlist et al., 2014a). Ainsi, elles forment un réseau dense s'étalant sur l'ensemble du tractus digestif (Rühl, 2005), présent dans le plexus myentérique et sous muqueux (Figure 18). Elles entourent les neurones entériques formant un véritable réseau fonctionnel *via* leurs jonctions communicantes. Chez l'homme les CGE sont 5 à 10 fois plus nombreuses que les neurones entériques.

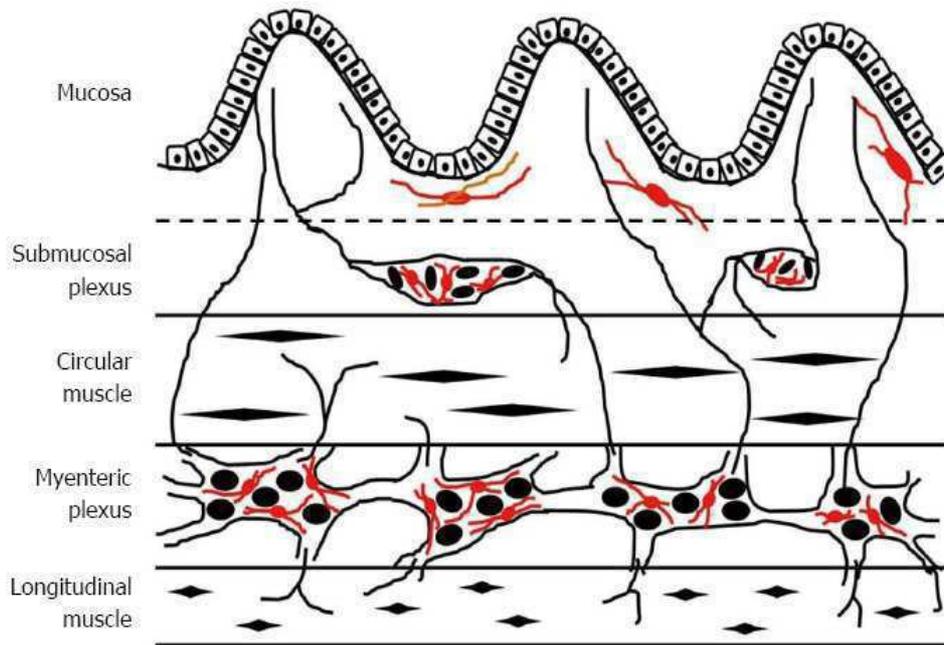


Figure 18: Représentation schématique de la distribution des cellules gliales dans la paroi intestinale.
(D'après Yu and Li, 2014)

Les cellules gliales sont représentées en rouge. On les retrouve dans la muqueuse intestinale directement sous les cellules épithéliales intestinales et dans les ganglions entériques des plexus sous-muqueux et myentériques du système nerveux entérique.

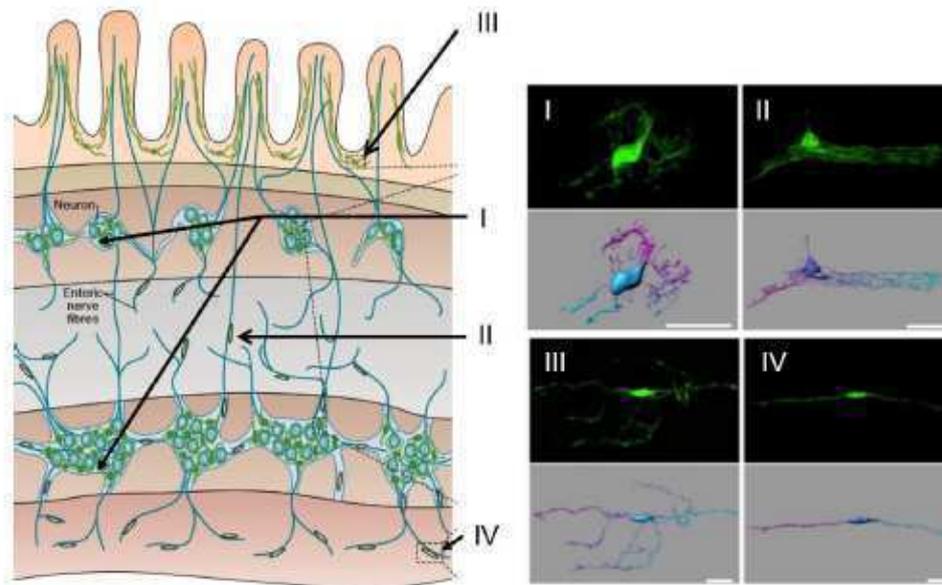


Figure 19: Caractéristiques anatomiques et morphologiques des quatre types de cellules gliales entériques.
(Adapté de Boesmans et al., 2015; Gulbransen and Sharkey, 2012).

Tout comme les astrocytes, les CGE présentent un corps cellulaire et des extensions de morphologies et de tailles variées (Boesmans et al., 2015). La classification actuelle des cellules gliales identifie quatre sous-types gliaux différents (Figure 19). Elle tient compte de la morphologie, de la localisation ainsi que des marqueurs exprimés (Boesmans et al., 2015; Gulbransen and Sharkey, 2012).

Le sous type I aussi appelé « astrocyte-like » est intra-ganglionnaire. Il est caractérisé par des extensions courtes, nombreuses et irrégulières. Il co-exprime les 3 marqueurs gliaux que sont GFAP, S100- β et Sox10. Il est impliqué dans l'intégration des informations paracrines d'origine neuronale dans le plexus myentérique (Boesmans et al., 2015; Gulbransen and Sharkey, 2012).

Le sous type II est situé au niveau des fibres inter-ganglionnaires et possède de nombreuses extensions longeant les fibres neuronales. Il exprime peu la GFAP.

Le sous type III est localisé dans la muqueuse et dispose de longues extensions. Il serait impliqué dans la régulation de la BEI. Comme le sous type II, il exprime peu la GFAP.

Le sous type IV est une cellule allongée longeant les fibres musculaires de la couche musculaire circulaire. Son rôle et le profil d'expression des marqueurs gliaux ne sont pas clairement définis (Gulbransen and Sharkey, 2012).

(b) Fonctions des cellules gliales entériques

Longtemps considérées comme simples cellules de soutien des neurones, il est démontré aujourd'hui que les CGE interagissent avec les autres types cellulaires présents dans leur environnement. Ce réseau glial forme ainsi un réseau dense situé à proximité des autres types cellulaires proches du SNE, notamment les vaisseaux sanguins et les cryptes intestinales (Neunlist et al., 2008). Cette proximité leur permet de réguler les fonctions neuronales (neuroprotection, croissance, différenciation) et les fonctions clés de la BEI telles que la prolifération, la différenciation des CEI, la réparation de la barrière, mais aussi sa perméabilité/résistance aux pathogènes. Elles semblent également jouer un rôle dans la réponse immunitaire du TD.

✓ Les interactions neuro-gliales

Le rôle de support a été le premier rôle attribué à la cellule gliale. C'est d'ailleurs ce qui leur a valu leur nom, *glia* dérivant du mot grec « glue » (Rühl, 2005). Les CGE favorisent la mise en place et le maintien de l'organisation ganglionnaire des neurones entériques. Ce rôle est lié principalement à la présence des gliofilaments qui permettent l'ancrage des CGE à la surface des ganglions (Gabella, 1990). Ainsi, ce soutien permet aux neurones entériques de résister aux contraintes mécaniques générées au niveau de l'intestin.

Une implication des CGE dans le contrôle de la survie neuronale est également suggérée notamment par analogie avec les astrocytes du SNC. En effet, elles sécrètent différents facteurs tels que le GDNF (*Glial cell-derived neurotrophic factor*), le NGF (*Nerve growth factor*) ou la neurotrophine-3 (Hoehner et al., 1996), connus pour leurs rôles neurotrophiques et neuroprotecteurs pour les neurones du SNC. Ainsi, ces médiateurs gliaux sont impliqués dans la croissance et la différenciation neuronales. Ce rôle bénéfique dans la survie neuronale a été illustré sur modèle de souris transgéniques dépourvues de CGE. Chez ces souris, on observe une dégénérescence des neurones entériques qui se caractérise par une diminution du nombre et de la taille des neurones (Bush et al., 1998). Les travaux de l'unité sur modèle de cultures primaires de SNE soumis à un stress oxydant appuient le rôle important des CGE dans la neuroprotection. Ils impliquent deux facteurs gliaux : le glutathion réduit (Abdo et al., 2010) qui modifie le microenvironnement et bloque les agents pro-oxydants, et la 15-désoxy-D12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) (Abdo et al., 2012). Plus récemment, il a également été montré que les CGE jouent un rôle dans le développement neuronal *via* des voies purinergiques dépendantes du GDNF (Le Berre-Scoul et al., 2017).

Enfin, les CGE interviennent dans la neurotransmission, notamment dans la synthèse et l'élimination des neuromédiateurs et dans l'intégration du message neuronal. Par exemple, la destruction partielle des CGE conduisant à une diminution du niveau d'expression du monoxyde d'azote (NO) et du VIP dans les neurones entériques, montrent leur implication dans la transmission nitreurgique et peptidergique (Aubé et al., 2006).

✓ Les interactions glio-épithéliales

Si le rôle des CGE dans la régulation de la BEI n'est pas encore totalement décrypté, plusieurs mécanismes ont déjà été mis en évidence (Figure 20).

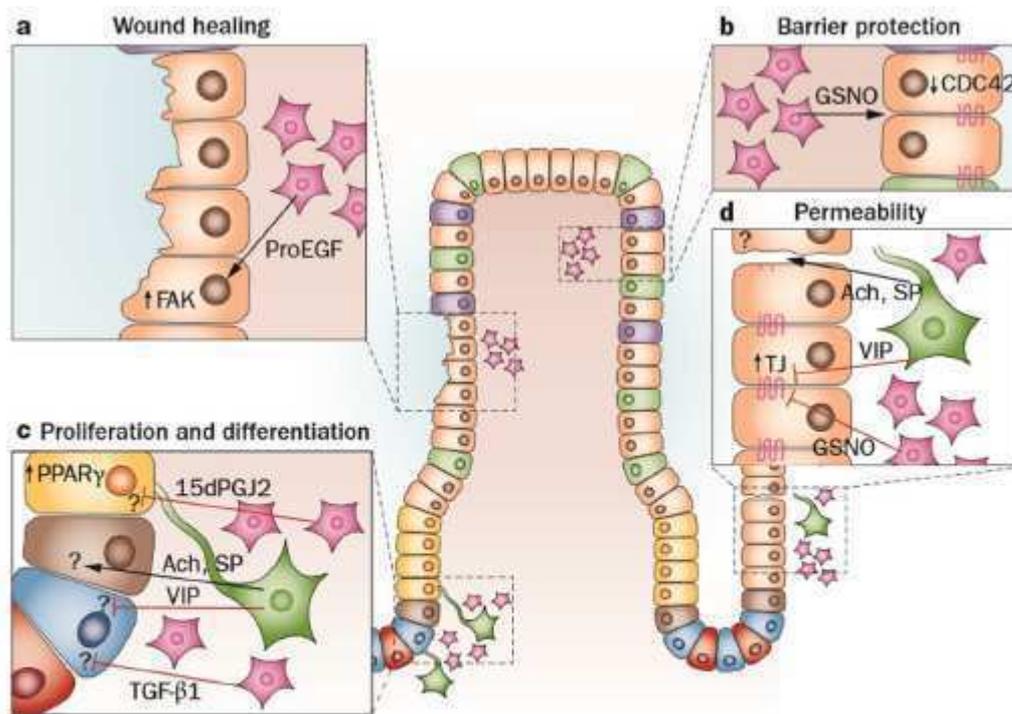


Figure 20: Rôle des cellules gliales entériques dans la régulation des fonctions de la barrière épithéliale (D'après Neunlist et al., 2013)

La relation glio-épithéliale et le rôle des CGE dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie de la BEI ont été démontrés sur modèles animaux. En effet, l'ablation des CGE *in vivo* conduit à une inflammation intestinale majeure précédée d'une rupture de la BEI (Aubé et al., 2006; Savidge et al., 2007a; Van Landeghem et al., 2011). Les modèles murins de destruction des CGE ont permis de montrer que les CGE inhibent la prolifération des CEI et augmentent la résistance de la BEI (Aube et al., 2006; Savidge et al., 2007). Cette relation glio-épithéliale apparaît similaire aux interactions que les astrocytes entretiennent avec les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. En effet, la destruction spécifique *in vivo* des astrocytes entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, associée à une modification de l'expression et de la localisation cellulaire des protéines des jonctions serrées (Willis

et al., 2004). Il a été d'autre part démontré que les astrocytes inhibent la prolifération des cellules endothéliales et induisent une augmentation de leur différenciation (Garcia et al., 2004). Par analogie aux astrocytes du SNC, on attribue aux CGE un rôle similaire sur la BEI.

Des études *in vitro* sur modèles de coculture (CEI/CGE ou CEI/SNE) ont également montré que les CGE étaient des régulateurs des fonctions des CEI. En effet, les CGE renforcent la BEI (Flamant et al., 2011; Soret et al., 2013), améliorent la cicatrisation (Van Landeghem et al., 2011) et inhibent la prolifération des CEI (Bach-Ngohou et al., 2010; Neunlist et al., 2007a; Soret et al., 2013). Ce contrôle est assuré par des médiateurs neuro-gliaux, tels que le facteur VIP (Neunlist et al., 2003b), le TGF- β 1 (*transforming growth factor beta 1*) (Neunlist et al., 2007b), ou encore le glutathion nitrosylé (GNSO) (Savidge et al., 2007b). Le facteur neurotrophique GDNF a également des propriétés renforçant la BEI (Meir et al., 2016). Le GSNO glial diminue la perméabilité intestinale et protège la BEI contre l'infection par le pathogène *Shigella flexneri* (Flamant et al., 2011; Savidge et al., 2007b). Les CGE inhibent la prolifération des cellules épithéliales intestinales *via* la libération de TGF- β 1 (Neunlist et al., 2007b). Enfin, le GDNF et le NO sécrétés par les CGE régulent respectivement la survie des CEI et le transport d'ions (MacEachern et al., 2011; Steinkamp et al., 2012a).

Plus récemment, il a été mis en évidence une modification du transcriptome des CEI après 24 heures de coculture en présence de CGE. L'analyse de 116 gènes exprimés de façon différentielle suggère que les CGE régulent les fonctions de prolifération, différenciation, motilité et d'adhérence cellulaire des CEI (Van Landeghem et al., 2009). Cette étude a permis d'identifier de nouveaux médiateurs gliaux impliqués dans ces processus. Ainsi, les mécanismes de réparation de la BEI sont contrôlés en partie par la sécrétion par les CGE de ProEGF (*Pro Epidermal Growth Factor*) (Van Landeghem et al., 2011) et les mécanismes de prolifération et de différenciation des CEI sont modulés par la 15d-PGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010). Cette dernière est le principal ligand naturel du récepteur nucléaire PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor*). Les CGE produisent également d'autres acides gras polyinsaturés comme la 15-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) et la 11-prostaglandine F2 qui régulent respectivement la perméabilité (Pochard et al., 2016) et la cicatrisation de la BEI (Aubé et al., 2006; Savidge et al., 2007a). Au cours de ce travail de thèse, nous nous intéresserons à deux autres médiateurs appartenant à la classe des eicosanoïdes et potentiellement sécrétés par les CGE, à savoir la PGD2 et la PGE2.

c) Les CGE : cibles ou acteurs dans les MICI?

(1) Modifications phénotypiques et fonctionnelles

Dans les pathologies inflammatoires digestives, le SNE a tout d'abord été considéré comme une cible de l'inflammation devant l'observation de nombreuses lésions et de modification morphologiques, neurochimiques et fonctionnelles (Lomax et al., 2005; Vasina et al., 2006; Villanacci et al., 2008). Cependant, le modèle murin de destruction ciblée des CGE conduisant à une entérocolite fulminante a suggéré son implication dans la physiopathologie des MICI et dans le maintien de l'intégrité de la BEI (Bush et al., 1998). Il est maintenant admis que, comme les astrocytes du SNC, les CGE sont sensibles à leur environnement. En réponse à des lésions liées à un stress ou à l'inflammation, les astrocytes acquièrent de nouvelles propriétés et sont alors qualifiés de "glie réactive" (Pekny and Pekna, 2014). Cette réaction se caractérise notamment par une prolifération cellulaire, une augmentation de la production de cytokines et de l'expression du marqueur glial GFAP. Dans le SNE, de la même façon, des modifications de l'expression des marqueurs gliaux sont observées au cours de nombreuses pathologies digestives. Ainsi, chez des patients présentant une MICI, une hypertrophie et une hyperplasie des CGE ainsi qu'une augmentation des marqueurs gliaux GFAP, S100- β , et Sox10 sont décrits (Cornet et al., 2001; Villanacci et al., 2008). L'impact exclusivement bénéfique de l'induction d'une glie réactive sur les tissus cérébraux reste débattu (Lomax et al., 2005; Sofroniew, 2009, 2015). En effet, même si elle est impliquée dans la réparation de la barrière hématoencéphalique, elle semble aussi à long terme être délétère sur les fonctions cérébrales (Faulkner et al., 2004; Hamby and Sofroniew, 2010). Au regard des nombreuses similitudes entre les astrocytes et les CGE, le concept de « glie réactive » ou gliose semble pouvoir être étendu aux CGE dans le contexte des pathologies inflammatoires intestinales. Ainsi, dans les MICI, les changements phénotypiques et fonctionnels des CGE observés et, au préalable bénéfiques pour l'homéostasie de la BEI, pourraient s'avérer délétères sur le long terme (Pochard et al., 2018) (Figure 22).

Premièrement, les CGE, tout comme les astrocytes, sont soumises à l'environnement qui les entoure tels que les autres composants cellulaires ou les pathogènes traversant la BEI au cours des pathologies digestives. Des travaux ont démontré des interactions entre les CGE et le mi-

crobiote intestinal. Par exemple, le maintien du nombre de CGE dans la muqueuse est dépendant du microbiote (Kabouridis et al., 2015). Des facteurs alimentaires ont également été décrits comme susceptibles de moduler le phénotype et les fonctions des CGE (Baudry et al., 2012; Steinkamp et al., 2012b). Cependant, le concept de glie réactive est basé en grande partie sur le fait que les CGE détiennent la machinerie cellulaire nécessaire à l'intégration d'un signal inflammatoire. Le phénotype des CGE et leurs fonctions sont modulés par des cytokines telles que le TNF α (pour *Tumor Necrosis Factor Alpha*) et l'IL1 β dont elles expriment les récepteurs (Margolis et al., 2011; Stoffels et al., 2014). L'intégration d'un signal inflammatoire est également possible *via* les TLR. Elles expriment en effet les TLR2, TLR3, TLR4 et TLR7 (Anitha et al., 2012; Barajon et al., 2009; Brun et al., 2013). Les CGE ont donc un rôle à part entière dans le processus inflammatoire. Ceci est appuyé par des études sur modèles murins montrant une diminution de la sensibilité à l'induction d'une colite chez des souris knockout pour les récepteurs TLR2 et TLR4 exprimés par les CGE (Brun et al., 2013; Esposito et al., 2014). De même, sur modèle murin d'iléus postopératoire, l'activation du récepteur de l'IL1 des CGE semble responsable de la réponse inflammatoire (Stoffels et al., 2014).

Deuxièmement, en réponse à ce signal inflammatoire, les CGE sont capables de proliférer (Mosnier et al., 2009) et subissent des modifications phénotypiques et fonctionnelles. L'impact bénéfique ou délétère de cette « glie réactive » n'est pas clairement établi. La prolifération des CGE est objectivée par une augmentation de l'expression des marqueurs gliaux S100- β et GFAP (von Boyen et al., 2006a; Cirillo et al., 2011; Turco et al., 2014). L'augmentation de la protéine S100 β serait bénéfique puisqu'elle est connue pour avoir une action neurotrophique (Huttunen et al., 2000). Une variation des concentrations calciques intracellulaires (Murakami et al., 2009) et une modification de l'expression des récepteurs du NGF (*Nerve growth factor*) (von Boyen et al., 2006b), de l'endothéline (von Boyen et al., 2010) ou encore du TLR4 (De Filippis et al., 2014) sont également observées. Cette réaction se caractérise aussi par la libération de médiateurs gliaux et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et IL1- β (Ruhl, 2005; Ruhl et al., 2001), la PGE2 (Murakami et al., 2009) ou encore le NO (Cirillo et al., 2011; Turco et al., 2014). La libération d'IL6 et d'IL1- β permet en outre d'activer la mise en place de l'immunité innée de la BEI en recrutant sur le site de l'inflammation des cellules immunitaires comme les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (von Boyen et al., 2006a). L'activation gliale liée à l'inflammation conduit également à la production de facteurs neurotrophiques tels que le GDNF, le BDNF (*Brain-Derived*

Neurotrophic Factor) et le NGF (Coelho-Aguiar et al., 2015). En effet, *in vitro*, leur production gliale est induite suite à une stimulation par l'IL1- β , le TNF- α ou le lipopolysaccharides (LPS) (von Boyen et al., 2006b, 2011). L'effet antiapoptotique exercé par la production de GDNF serait à la fois bénéfique sur les CEI et sur les CGE par voie autocrine (Steinkamp et al., 2012a). Le BDNF protège aussi les CGE de l'apoptose induite par la production des cytokines pro-inflammatoires (Steinkamp et al., 2012b). De plus, sur modèle murin de colite, le GDNF entraîne une diminution de la perméabilité intestinale et réduit l'inflammation (Zhang et al., 2010). Enfin, la production gliale de GDNF aurait un rôle dans la régulation de l'inflammation de la muqueuse intestinale en cas d'infection *via* la régulation de la production d'IL-22 (Ibiza et al., 2016).

Troisièmement, comme les astrocytes, les CGE expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I) de façon constitutive (Geboes et al., 1992), alors que l'expression gliale du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) impliqué dans l'immunité adaptative est induite en condition inflammatoire *via* le LPS, l'interféron γ (IFN γ) (Cirillo et al., 2011) ou suite à l'invasion par une souche d'*Escherichia Coli* entéro-invasive (Turco et al., 2014). L'implication des CGE dans la réponse immunitaire adaptative reste à l'heure actuelle à préciser. Néanmoins, les CGE auraient un rôle immunosuppresseur en condition inflammatoire : il a été montré à partir de modèles de cocultures que des CGE humaines inhibaient la prolifération des lymphocytes T activés (Kermarrec et al., 2016). De plus, l'effet immunosuppresseur des CGE sur les lymphocytes T semble plus important chez des patients présentant une MC par rapport aux sujets témoins (Kermarrec et al., 2016).

Au final, au regard de l'ensemble des données, si comme les astrocytes du SNC, l'activation des CGE en condition inflammatoire semble bénéfique en premier lieu, elle pourrait s'avérer néfaste au cours du temps et participer aux mécanismes physiopathologiques des MICI. En effet, l'un des éléments clés de la physiopathologie des MICI est une altération des fonctions de la BEI et en particulier une augmentation de sa perméabilité. Etant donné que les CGE régulent l'homéostasie de la BEI, il est légitime de supposer que les altérations fonctionnelles et morphologiques des CGE pourraient en être à l'origine. Dans ce sens, si les cytokines pro-inflammatoires, TNF α et IFN γ , activent les CGE, elles conduisent également à leur apoptose suite à une exposition à long terme (Coelho-Aguiar et al., 2015). Deux études récentes de notre laboratoire mettent aussi en évidence une altération fonctionnelle des CGE dans la MC. Nous avons montré une perte des fonctions impliquées dans la régulation de l'homéostasie

dans les CGE issues de patients atteints d'une MC en comparaison à celles issues de patients sains, ainsi qu'une diminution de la production de marqueurs gliaux d'origine lipidique (Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016).

Une étude récente, transcriptomique à haut débit, sur CGE activées par un traitement au LPS confirme le large champ d'action des CGE « activées » sur les cellules environnantes (Rosenbaum et al., 2016). Il est admis que la relation glio-épithéliale est liée en partie à des médiateurs gliaux (Neunlist et al., 2013). En tout état de cause, une modification de la synthèse de ces différents médiateurs en condition inflammatoire liée aux altérations des CGE pourrait être un élément participant à l'altération de la BEI observée dans les MICI (Figure 21).

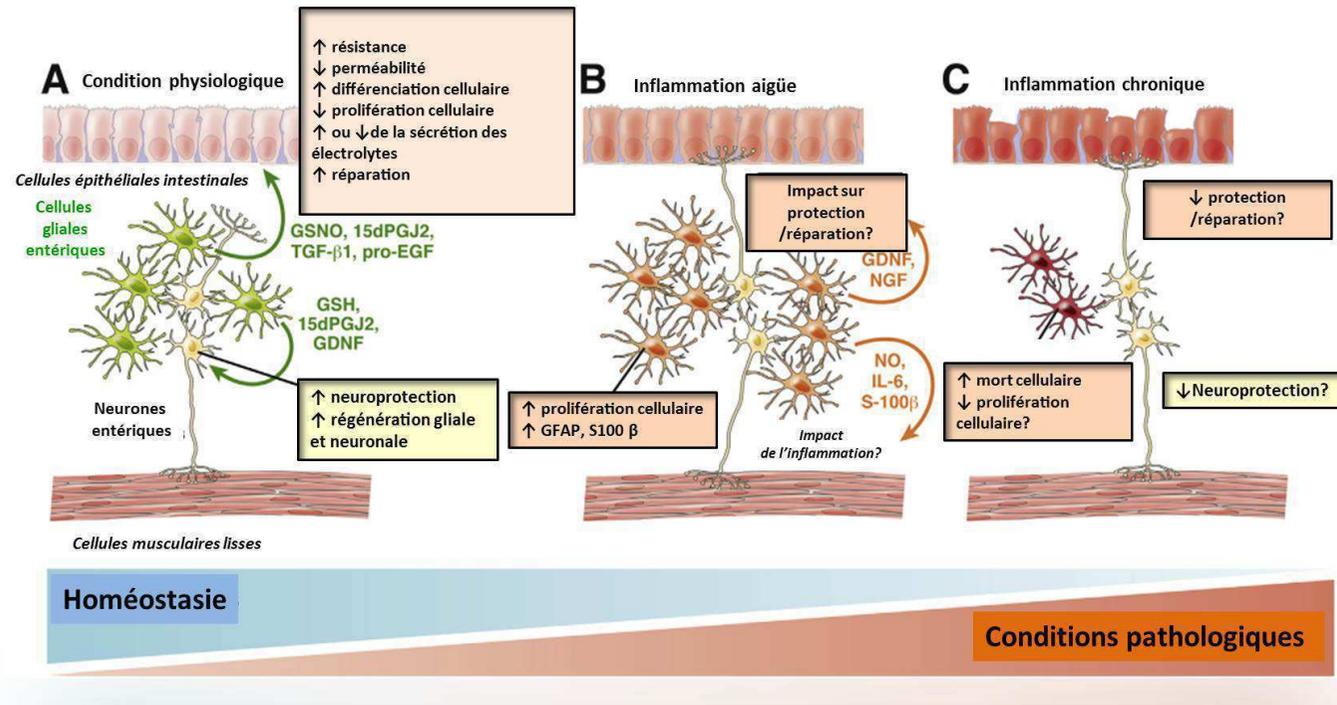


Figure 21: Rôle des cellules gliales entériques dans l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale et dans les pathologies digestives (D'après Neunlist et al, 2014)

(A) En condition physiologique, les CGE régulent diverses fonctions neuronales telles que la neuroprotection, le renouvellement neuronal ou encore l'expression de neuromédiateurs. Elles ont également un rôle central dans l'homéostasie de la BEI via la sécrétion de médiateurs solubles. (B) En condition inflammatoire, on observe une prolifération des CGE, appelé gliose. Ce phénomène pourrait à la fois participer au développement de l'inflammation intestinale et à la protection/réparation des dommages causés par l'inflammation au niveau neuronal et de la BEI. (C) L'apoptose induites des CGE en condition inflammatoire pourraient contribuer à la dégénérescence neuronale ou aux dysfonctionnements de la BEI observés dans les pathologies digestives

(2) *Altérations du profil lipidique des CGE*

Dans le contexte des MICI, de nombreuses études rapportent une altération de la production d'eicosanoïdes ou une modulation de l'expression de leurs enzymes de synthèse (Stenson, 2014; Wallace, 2018). Les eicosanoïdes sont des composés clés dans l'induction et la résolution de l'inflammation et leur rôle au cours des MICI commence à être étudié. L'acide arachidonique (AA) est métabolisé par trois voies biochimiques majeures : la voie des cyclooxygénases (COX) conduisant à la synthèse des prostaglandines, prostacycline et thromboxane; la voie des lipoxygénases (LOX) conduisant à des acides gras hydroxyeicosatétraenoïques et des leucotriènes; la voie de l'époxygénase dépendante de P450 qui génère les époxyeicosanoïdes. Une étude lipidomique récente de l'UMR1235 a montré une diminution de la production de quatre médiateurs appartenant aux eicosanoïdes par les CGE de patients présentant une MC : le 15-HETE, le 18-HEPE, la 15d-PGJ2 et le 11 β PGF2 α (Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016). Un rôle de régulation sur les fonctions de la BEI et/ou dans la neuroprotection a d'ores et déjà été identifié pour trois d'entre eux (Abdo et al., 2010, 2012; Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016). Ainsi, une altération de leur production pourrait être un des éléments de la physiopathologie des MICI.

✓ 15-dPGJ2

La 15d-PGJ2 est une prostaglandine dérivant de la PGD2, suite à une double déshydratation. Elle est connue pour être impliquée dans différentes voies de signalisation (Straus and Glass, 2001). La voie la plus connue est celle permettant l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ , dont elle est le principal ligand naturel. Ses effets physiologiques peuvent également impliquer d'autres voies comme la voie Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) qui est activée par la 15d-PGJ2 (Abdo et al., 2012) ou la voie NF-kB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) qui est inhibée par la 15d-PGJ2 (Straus et al., 2000). Plusieurs travaux ont permis d'éclairer le rôle de la 15-dPGJ2 au sein de l'UNGE. La première étude a permis d'identifier la 15 d-PGJ2 comme un facteur glial impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par l'intermédiaire de la voie PPAR γ (Bach-Ngohou et al., 2010). Pour cela, il a été montré que les CGE expri-

maient la lipocaline prostaglandine D synthase (LPGDS), enzyme nécessaire à la production de la 15d-PGJ2. Ensuite, sur un modèle de coculture CGE/CEI, a été confirmé l'effet antiprolifératif des CGE sur les CEI. L'effet antiprolifératif observé est bien médié par la voie PPAR γ puisqu'il est inhibé par l'ajout d'un antagoniste spécifique de PPAR γ , le GW9662. Enfin, l'implication de la 15d-PGJ2 *via* la voie PPAR γ dans la modulation de la différenciation des CEI a été démontrée. En effet, l'ajout de GW9662 inhibe l'augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation cellulaire des CEI, l'E-cadhérine et la phosphatase alcaline.

La 15d-PGJ2 est également connue pour son rôle neuroprotecteur sur le SNC. Elle prévient notamment la mort neuronale induite dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Lin et al., 2006). D'autres travaux ont été réalisés pour évaluer le rôle protecteur potentiel de la 15d-PGJ2 d'origine gliale sur les neurones entériques. Il a été montré que la 15d-PGJ2 entraînait une diminution de la mort neuronale induite par un stress oxydant (Abdo et al., 2012). Comme pour l'étude précédente démontrant le rôle anti prolifératif de la 15d-PGJ2 d'origine gliale, son rôle dans l'effet neuroprotecteur a été démontré grâce à une approche ARN interférence inhibant la synthèse de la 15d-PGJ2. Néanmoins, les effets neuroprotecteurs observés ne semblent pas médiés par la voie PPAR γ puisque l'incubation d'une lignée neuronale avec un agoniste de PPAR γ ne les reproduit pas. Les résultats obtenus suggèrent par contre l'implication de la voie Nrf2. Ce facteur de transcription jouerait un rôle dans la régulation de la protection cellulaire contre le stress oxydant via la production de glutathion (Kobayashi et al., 2009). En effet, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression protéique de Nrf2 suite à l'incubation d'une lignée neuronale avec des CGE ainsi qu'une augmentation de l'expression des ARNm des cibles de Nrf2 suite au traitement d'une lignée neuronale par la 15d-PGJ2. Enfin, à partir de culture primaire de SNE, il a été montré une augmentation intracellulaire du glutathion dans les neurones entériques traités par la 15d-PGJ2.

Les effets bénéfiques de la 15d-PGJ2 d'origine gliale au sein de l'UNGE sont résumés dans la figure 22.

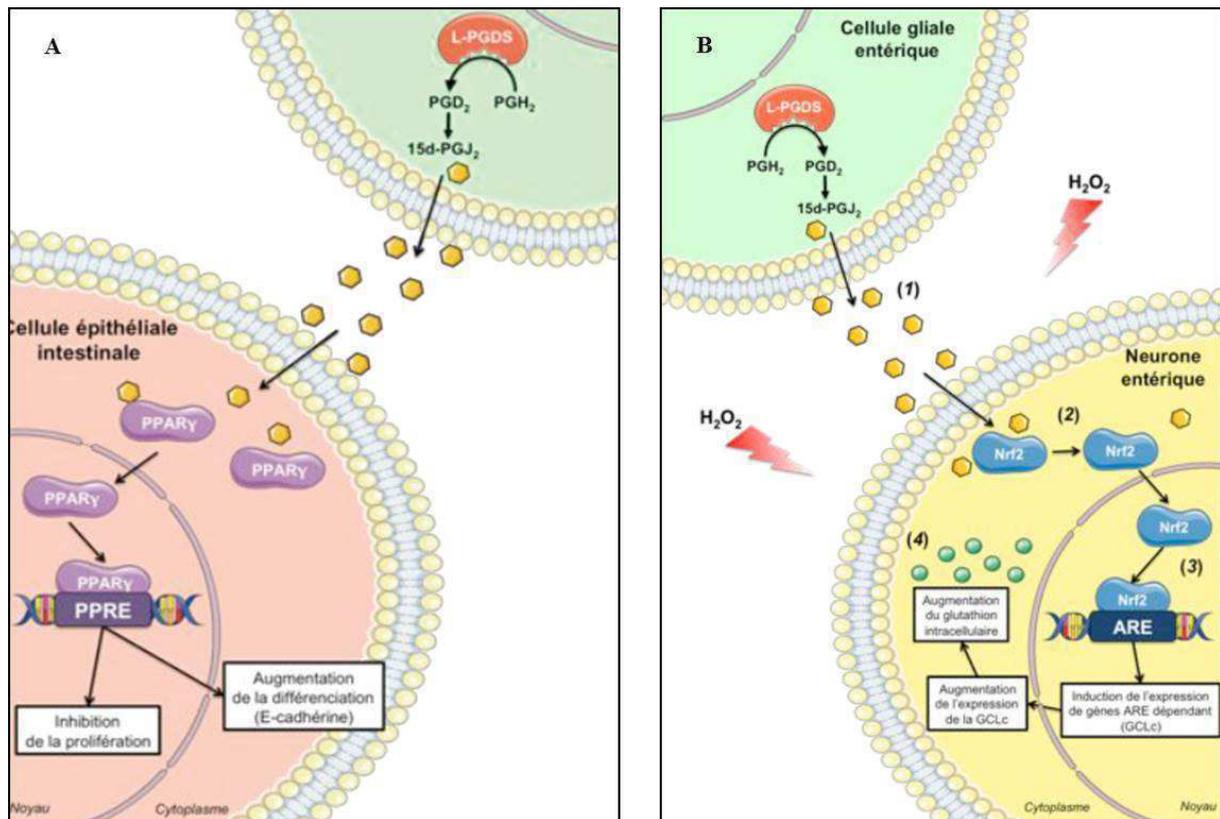


Figure 22: Rôle de la 15d-PGJ2 d'origine gliale dans l'unité neuro-glio-épithéliale

(A/ Schéma récapitulatif de la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ2 gliale ; .B/Schéma récapitulatif de la régulation de la neuroprotection par la 15d-PGJ2 gliale. Extrait de la thèse de M Mahé, « les cellules gliales entériques : source de 15d-PGJ2 impliquée dans le contrôle des fonctions de la BEI et dans la survie neuronale », 2012)

✓ 11βPGF2α

Comme la 15d-PGJ2, le 11βPGF2α dérive de la PGD2. La PGD2 est rapidement métabolisée et subit des réactions enzymatiques donnant lieu à la formation de 11βPGF2α. A l'heure actuelle, le rôle du 11βPGF2α a été très peu étudié et les données de la littérature portent essentiellement sur son rôle dans la réaction allergique. Le 11βPGF2α est un agoniste du récepteur chimioattractant DP2 (Sandig et al., 2006). Son rôle au sein de l'UNGE et plus particulièrement sur la BEI a été étudié suite à la mise en évidence d'une diminution de sa synthèse gliale chez les patients présentant une MC par rapport à des sujets sains. Ainsi, à partir d'un modèle de coculture CGE/CEI, il a été montré que le 11βPGF2α d'origine gliale avait un rôle bénéfique sur l'étalement et la réparation épithéliale. Il a également été mis en évidence que le rôle réparateur sur la BEI serait dépendant des voies DP2 et PPARγ. En effet, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur DP2 (CAY10595) et d'un antagoniste de PPARγ

(GW9662) bloquent les effets bénéfiques observés lors de l'ajout de $11\beta\text{PGF}2\alpha$ (Coquenlorge et al., 2016).

✓ 15-HETE

Le 15-HETE est synthétisé à partir de l'acide arachidonique par les lipoxygénases 15-LOX1 et 15-LOX-2. De façon intéressante, il a été montré une sous-expression de 15-LOX2 dans la muqueuse colique humaine chez les patients atteints d'une RCH (Mangino et al., 2006), associée à la réduction de la production de 15-HETE (Kaser et al., 2010; Mangino et al., 2006). Le rôle du 15-HETE sur la BEI est peu connu. Il jouerait un rôle sur la croissance cellulaire (Cabral et al., 2013) et sur la perméabilité (Ohata et al., 2005). Les travaux récents de l'unité ont montré une expression de la 15 LOX2 dans les CGE humaines et une baisse de la production de 15-HETE issus des CGE provenant de patients atteints de la MC. Le rôle bénéfique du 15-HETE sur la perméabilité paracellulaire de la BEI à partir d'un modèle de coculture a été mis en évidence. Ce dernier serait lié à une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 via une voie dépendante de l'AMPK (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (Pochard et al., 2016).

Ces différents travaux effectués dans notre unité ont permis de caractériser la production de nombreux médiateurs lipidiques par les CGE. Certains comme la $15d\text{-PGJ}2$, le $11\beta\text{PGF}2\alpha$ et la 15-HETE jouent un rôle dans la régulation des fonctions de la BEI. L'inflammation intestinale, au cours des MICI, semble moduler leur production pouvant expliquer en partie les effets délétères observés sur la BEI. Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressées à 2 médiateurs lipidiques la $\text{PGD}2$ et la $\text{PGE}2$ et leurs rôles dans l'UNGE.

III. Prostaglandines D2 et E2

a) Voies de synthèse des prostaglandines

Les PGs sont des médiateurs lipidiques, dérivés de l'AA, appartenant à la superfamille des eicosanoïdes. L'AA est libéré à partir des phospholipides membranaires sous l'action des phospholipases A2. Il est ensuite métabolisé par les cyclooxygénases en PGH2 qui servira de substrat aux différentes prostaglandines synthases. Les prostaglandines sont impliquées dans de nombreux systèmes, à savoir : le système nerveux central, cardiovasculaire, gastro-intestinal, génito-urinaire, endocrine, respiratoire et immunitaire (Hata and Breyer, 2004). Elles agissent selon un mode autocrine et/ou paracrine, et peuvent exercer soit une action anti-inflammatoire soit pro-inflammatoire. En effet, leur rôle est déterminé par de nombreux facteurs comme le profil d'expression de leurs récepteurs, la nature, la concentration et l'affinité de leurs ligands ou encore les voies de signalisation spécifiques activées par leurs récepteurs. Leur implication dans de nombreuses pathologies dont certains cancers, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et l'hypertension a d'ores et déjà été décrite. Ainsi, elles constituent d'excellentes cibles thérapeutiques. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens bloquant la synthèse des prostaglandines *via* l'inhibition des cyclooxygénases sont utilisés pour leurs activités antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire.

(1) *Phospholipase A2*

La première étape dans la voie de synthèse des prostaglandines est la libération de l'AA estérifié en position sn-2 des phospholipides membranaires (Balsinde et al., 2002). Les phospholipases responsables de l'hydrolyse de l'AA sont les phospholipases A2. Il en existe une quinzaine différentes chez les mammifères, réparties en trois classes majeures, à savoir :

- les PLA2 sécrétées (sPLA2). Elles ont un faible poids moléculaire (14-19 kDa) et regroupent 10 enzymes distinctes identifiées. Leur activité requiert la présence de calcium en concentration élevée, est stimulus indépendante et non spécifique de l'acide gras hydrolysé (Murakami and Kudo, 2002). Elles sont principalement retrouvées dans les tissus immunitaires et dans les organes du tractus digestifs (Park et al., 2006).
- les PLA2 (iPLA2). Elles ont un poids moléculaire supérieur (85-90 kDa). Elles sont également non spécifiques de l'acide gras porté en sn-2 mais à l'inverse des sPLA2, elles ne nécessitent pas de calcium pour fonctionner. Elles sont présentes de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et des tissus (Murakami et al., 2011).
- les PLA2 cytosoliques (cPLA2). Elles existent sous trois isoformes. Leur poids moléculaire varie entre 85 et 110 kDa. Elles sont faiblement calcium dépendante et sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules et tissus (Murakami et al., 2011).

Bien que les différentes formes de PLA2 possèdent la capacité de libérer l'AA des phospholipides membranaires, la cPLA2 α semble être l'enzyme principalement impliquée dans la synthèse des eicosanoïdes, en raison de sa sélectivité pour le clivage de l'AA en position sn-2 (Leslie 2004; Burke and Dennis 2009).

(2) *Cyclooxygénases*

Les COX portent également le nom de prostaglandine endoperoxyde H synthase (PGHS). Ce sont les enzymes catalysant la première étape de la synthèse des eicosanoïdes. Deux isoformes majeures ont été décrites: COX1 et COX2 (Park et al., 2006).

COX1 et COX2 ont respectivement un poids moléculaire de 70 kDa et 72 kDa. Bien que codées par des gènes distincts, ces deux isoformes sont d'un point de vue structural très semblables et présentent une homologie de 63% (Chandrasekharan and Simmons, 2004). Elles sont présentes au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire (Smith et al., 2000). L'expression de COX1 est relativement stable dans l'ensemble des cellules et tis-

sus. Elle est responsable de la synthèse basale des prostanoides impliqués dans des fonctions physiologiques et, est exprimée de façon constitutive. A la différence de COX1, l'expression de COX2 est plus restreinte. Hormis dans le SNC, où elle est exprimée de façon constitutive, son expression est induite suite à différents stimuli. Les inducteurs de COX2 sont essentiellement des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires comme le TNF α , LPS et IL1 β , d'où son implication dans plusieurs pathologies inflammatoires (Park et al., 2006; Tanabe and Tohnai, 2002). L'expression du gène COX2 est par ailleurs inhibée par les glucocorticoïdes et les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL4 et l'IL10, *via* la production de l'inhibiteur I-kB et *via* la modification de la stabilité de l'ARN messenger COX2 (Loftin et al., 2002; Morita, 2002). Le rôle biologique de chaque isoforme COX1 ou COX2 a été défini grâce aux modèles de souris invalidées pour chacun de ces gènes ou pour les deux gènes (Loftin et al., 2002; Morita, 2002).

Ces 2 enzymes sont responsables de la biosynthèse des PGs, et thromboxanes à partir de l'AA converti en PGH2 (Figure 23). Après la libération de l'acide arachidonique, sous l'action de la phospholipase A2, les COX sont responsables d'une double transformation de l'acide arachidonique par son activité cyclooxygénase et peroxydase (Blackwell et al., 2010). Premièrement, COX initie la cyclisation de l'AA et ajoute un groupement 15-hydroxyperoxy pour former la PGG2. La COX réduit par la suite le groupement nouvellement formé de la PGG2 pour former la PGH2. La PGH2 est une molécule peu stable. Elle subira rapidement des catalyses enzymatiques, aboutissant à de nombreuses molécules actives dont la PGD2 et la PGE2.

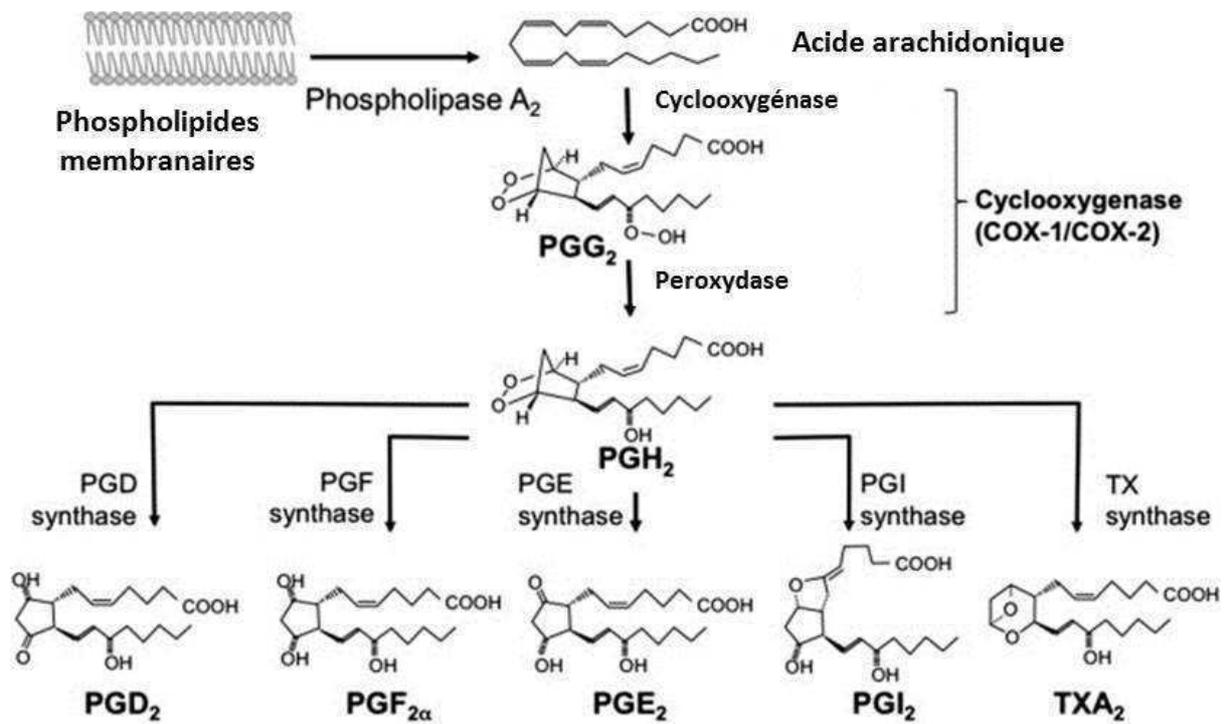


Figure 23: Voie des cyclooxygénases
(D'après Kawahara et al., 2015)

(3) Les Prostaglandines E synthases

Les enzymes responsables de la synthèse de PGE₂ à partir de la PGH₂ sont les prostaglandines E synthases (PGES). Trois isoformes ont été identifiées : la prostaglandine E synthase-1 microsomale (mPGES1), la prostaglandine E synthase-2 microsomale (mPGES2) et la prostaglandine E synthase cytosolique (cPGES) (Park et al., 2006) (Figure 24).

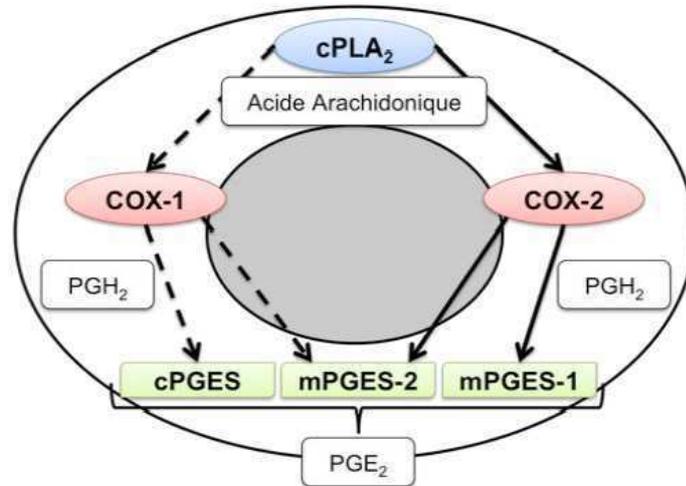


Figure 24 : Biosynthèse des prostaglandines E2 à partir des prostaglandines E synthases. (D'après Hara et al., 2010)

✓ La prostaglandine E synthase-1 microsomale

La mPGES-1 est une protéine de 16 kDa localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane péri-nucléaire. Elle convertit spécifiquement la PGH₂ en PGE₂ et requiert un cofacteur, le glutathion pour exercer son activité (Murakami et al., 2000). Tout comme l'isoforme COX2 avec laquelle elle se couple de façon préférentielle, la mPGES1 est la seule isoforme dont l'expression est stimulée par l'inflammation (Forsberg et al., 2000). La mPGES1 peut également être couplée à COX1 si la quantité d'AA est suffisamment élevée (Murakami et al., 2000). Ainsi, après un stimulus inflammatoire, l'expression de mPGES1 et COX2 est augmentée et les deux protéines sont transloquées à la membrane nucléaire. Cette proximité périnucléaire permet leur couplage (Murakami et al., 2000), COX2 convertissant l'AA en PGH₂, et mPGES1 transformant la PGH₂ en PGE₂, entraînant une sécrétion de PGE₂ (Figure 25). Son rôle dans l'inflammation a été montré chez des souris invalidées pour le gène codant pour la mPGES1. En effet, ces dernières présentent une réponse diminuée aux stimuli inflammatoires, douloureux ou tumorigènes (Trebino et al., 2003).

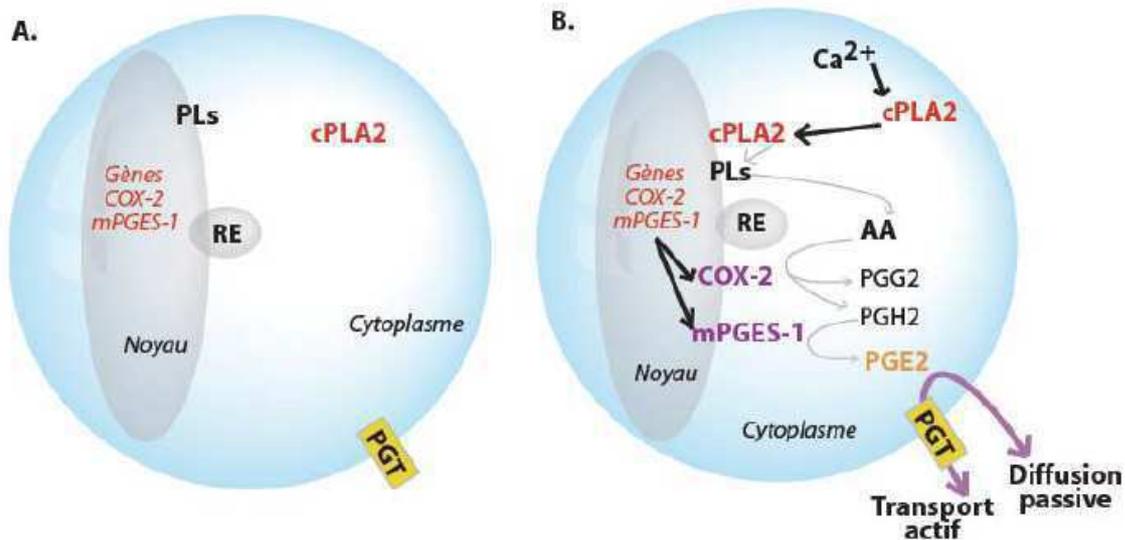


Figure 25: couplage préférentiel de la mPGES-1 avec la COX2
(Adapté de Pratt, Clinical Immunology, 2006)

A : Conditions normales ; B : En réponse à un stimulus, l'activation de l'expression génique aboutit à l'externalisation des enzymes COX-2 et mPGES-1. Leur couplage aboutit à une augmentation de la quantité de PGE2 (PLs = phospholipides, RE = réticulum endoplasmique, PGT = transporteur de la PGE2).

✓ Prostaglandine E synthase-2 microsomale

La mPGES2 est une protéine de 41 kDa. Contrairement à la mPGES1, l'activité de la mPGES2 n'est pas dépendante du glutathion (Tanikawa et al., 2002). Elle peut être couplée soit à COX1 soit à COX2, en fonction de l'environnement de la cellule. Son action nécessite l'élimination de sa partie N terminale indispensable à sa maturation. Elle est exprimée de façon constitutive dans les tissus où l'expression de la mPGES1 est faible. Une expression importante de la mPGES2 est retrouvée dans les cancers colorectaux humains, dans lesquels mPGES1 est également augmentée (Murakami et al., 2003).

A l'heure actuelle, les modèles murins d'inactivation de cette enzyme n'ont pas permis d'établir son rôle physiologique.

✓ Prostaglandine E synthase cytosolique

La cPGES est une protéine de 23 kDa, localisée dans le cytosol et présentant une activité dépendante du glutathion. D'expression constitutive, la cPGES semble interagir préférentiellement avec COX1 afin de maintenir la production de PGE2 pour assurer l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Tanioka et al., 2000). En effet, sa translocation du cytosol vers la région périnucléaire lui permet de s'assembler à COX1 pour produire de la PGE2. Son activation requière sa liaison à la protéine HSP90 et sa phosphorylation par la protéine « casein kinase 2 » (Ueno et al., 2005). Son rôle physiologique n'a pas encore été défini, les modèles murins invalidés pour la cPGES n'étant pas viable après la parturition (Lovgren et al., 2007; Nakatani et al., 2007).

(4) *Les Prostaglandines D synthases*

La synthèse de la PGD2, comme celle de l'ensemble des prostaglandines, est régulée *via* le couplage fonctionnel et différentiel des enzymes COX1 et COX2 aux différentes prostaglandines synthases, spécifiquement les PGD synthases (PGDS) pour la PGD2 (Ueno et al., 2005). Deux isoformes ont été identifiées : la forme hématopoïétique (HPGDS) et la forme lipocaline (LPGDS). Ces deux enzymes ont la même fonction, soit de catalyser l'isomérisation du groupement 9,11-endoperoxyde de la PGH2 en groupement 9-hydroxyle et 11-cétone afin de donner la PGD2 (Urade and Eguchi, 2002). Par la suite, une succession de réactions non enzymatiques permet la production de dérivés issus de la PGD2 : c'est le cas pour la 15d-PGJ2 et la 11 β PGF2 α .

✓ Prostaglandine D Synthase hématopoïétique

L'HPGDS est un membre de la classe des enzymes glutathion-S-transférases, enzymes cytosoliques jouant un rôle dans la détoxification enzymatique. Son action nécessite la présence de glutathion et elle est activée par le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Urade and Eguchi, 2002). Elle est largement distribuée dans les tissus périphériques et est exprimée dans les cellules présentatrices d'antigènes, les mastocytes, les lymphocytes Th2 (Tanaka et al., 2000). Ainsi, elle est décrite comme l'enzyme clé de la synthèse de la PGD2 par les cellules du système immunitaire et les mastocytes (Urade and Hayaishi, 2000). Au niveau intestinal, on retrouve principalement la HGPDS exprimée par les CEI, les mastocytes et les fibroblastes (Bach-Ngohou et al., 2010; Hokari et al., 2009; Park et al., 2007). De manière intéressante, il a été montré que des souris APC^{-/-} invalidées également pour la HPGDS, développaient plus rapidement des lésions tumorales, indiquant le rôle important de cette enzyme dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Park et al., 2007).

✓ Prostaglandine D Synthase lipocaline

La LPGDS est un membre de la famille des lipocalines, protéines impliquées dans la liaison et le transport de molécules lipophiles. C'est une glycoprotéine d'environ 20 à 30 kDa (en fonction du degré de glycosylation) avec 2 fonctions principales : le transport de molécules lipophiles et la production de PGD2 (Urade and Eguchi, 2002). Elle est en fait identique à la protéine β -trace, une protéine majeure du liquide céphalorachidien (Urade and Hayaishi, 2000). Son activité enzymatique nécessite la présence de composés thiols tels que le β -mercaptoéthanol ou le glutathion.

La LPGDS est présente principalement au niveau du réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire afin de produire la PGD2 (Beuckmann et al., 1999), dans plusieurs types cellulaires du SNC, des organes génitaux mâles, du cœur et dans différentes parties du tube digestif tel que l'estomac ou le côlon (Eguchi et al., 1997; Hokari et al., 2009, 2011; Urade, 1985). Etant aussi une protéine sécrétée, la LPGDS est retrouvée dans de nombreux fluides

tels que le LCR, le plasma séminal et la circulation sanguine (Urade and Eguchi, 2002), où elle agit comme transporteur de molécules lipophiles. De manière intéressante, l'expression de la LPGDS est régulée par de nombreuses voies de signalisation en fonction du contexte cellulaire. Ainsi, il a été montré une induction de l'expression de la LPGDS par les œstrogènes (Mong et al., 2003) ainsi que par des stimuli inflammatoires comme l'IL1 β (Hokari et al., 2009).

b) Récepteurs des prostaglandines

Les effets des PGE2 et PGD2 sont médiés par des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il existe quatre récepteurs de la PGE2 (EP1-4) et deux récepteurs de la PGD2 (DP1 et DP2).

Leurs rôles dans la régulation de la physiologie du tractus gastro-intestinal ou dans les pathologies digestives en particulier les MICI, ne sont pas clairement élucidés. Ils sont probablement liés à de nombreux facteurs comme le profil d'expression du récepteur, la nature et la concentration des ligands, l'affinité du ligand ou encore les voies de signalisations spécifiques activées par leurs récepteurs.

(1) Récepteurs de la prostaglandine E2

La PGE2 exerce de nombreuses fonctions dans l'organisme, suggérant l'implication de plusieurs récepteurs spécifiques. En effet, quatre types de récepteurs de PGE2 ont été identifiés, soit les récepteurs EP1, EP2, EP3, EP4 (Sugimoto and Narumiya, 2007).

✓ Structure et mode d'action des récepteurs

Les récepteurs EP sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs de type « rhodopsine », couplés aux protéines hétérotrimériques

G. Les quatre gènes codant pour les récepteurs EP sont différents. Cependant, un alignement de séquence révèle une faible homologie de séquence, de l'ordre d'environ 20 à 30% entre les différents récepteurs. Quelques différences structurales permettent également de différencier les quatre récepteurs. Des résidus amino-acides conservés et localisés principalement dans les parties transmembranaires et dans la seconde boucle extracellulaire des récepteurs, correspondent au site de reconnaissance pour la PGE₂ (Figure 26). La diversité des récepteurs est due à des variations de l'extrémité cytosolique C terminale qui les couple à des protéines G différentes. Un épissage alternatif de cette partie C terminale aboutit à la formation d'isoformes distinctes. Ainsi, huit isoformes humaines ont été rapportées pour le récepteur EP3.

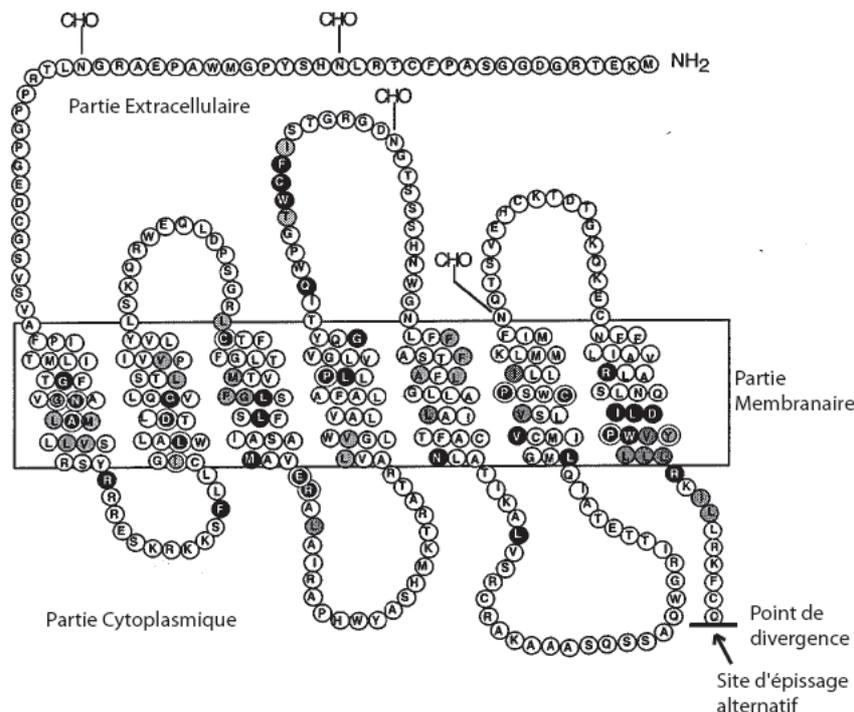


Figure 26: Structure du récepteur EP3
(D'après Breyer et al., 2001)

Le récepteur EP1 est couplé à une protéine G_{αq}. Son activation entraîne une augmentation intracellulaire de Ca²⁺ via la voie phospholipase C (PLC)-inositol triphosphate (IP₃). Les récepteurs EP2 et EP4, sont tous deux couplés à une protéine G_s. Leur activation stimule l'adénylate cyclase (AC), augmente la production d'AMPc et active la protéine kinase A (PKA). La PKA, à son tour, active alors des facteurs de transcription et stimule l'expression

de certains gènes. Les récepteurs EP3 sont couplés à la protéine Gi et inhibent l'action de l'AC. Une diminution de la concentration d'AMPc est donc observée lors de leur activation (Dey et al., 2006).

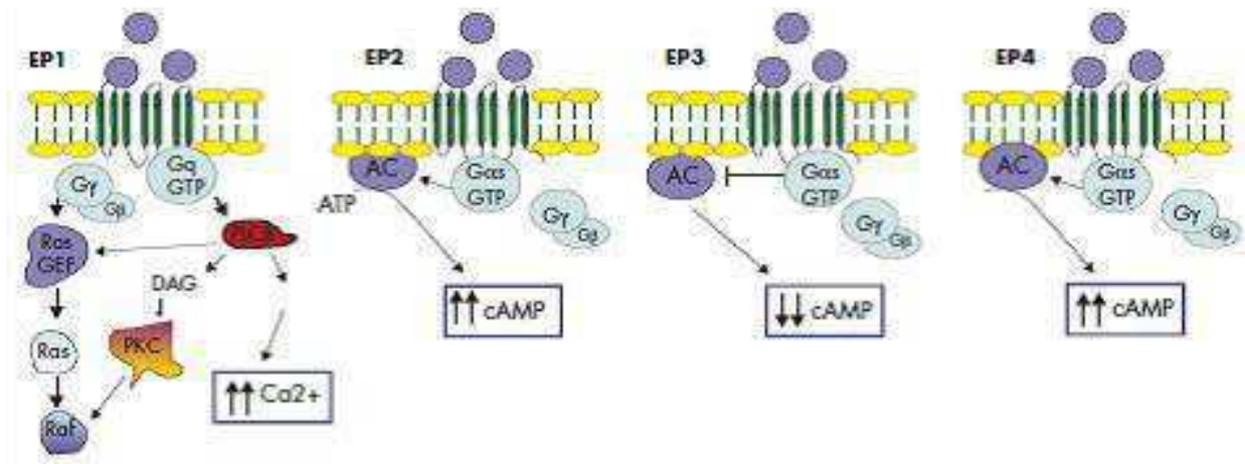


Figure 27: Représentation schématique des récepteurs prostanoides de type E et leurs voies de signalisation.
(Adapté de Zagani et al, 2009, Rôle des prostaglandines dans le cancer colorectal)

En plus des différences dans les voies de transduction du signal, les EP diffèrent aussi de par leur localisation. Si tous sont exprimés au niveau de la membrane plasmique, EP2 et EP4 sont également exprimés au niveau de la membrane nucléaire.

✓ Distribution tissulaire des récepteurs EP

Chaque récepteur est spécifiquement distribué dans l'organisme et leur niveau d'expression est variable selon les tissus (Figure 28). Parmi les quatre récepteurs, EP3 et EP4 sont les plus largement exprimés dans l'organisme notamment dans le rein, le système nerveux central, le système digestif, l'utérus et les plaquettes humaines. La distribution de EP1 est quant à elle limitée à quelques organes tels que le rein, l'estomac et les poumons. Le récepteur EP2 est localisé principalement dans l'utérus où il intervient dans l'implantation utérine de l'embryon (Sugimoto and Narumiya, 2007).

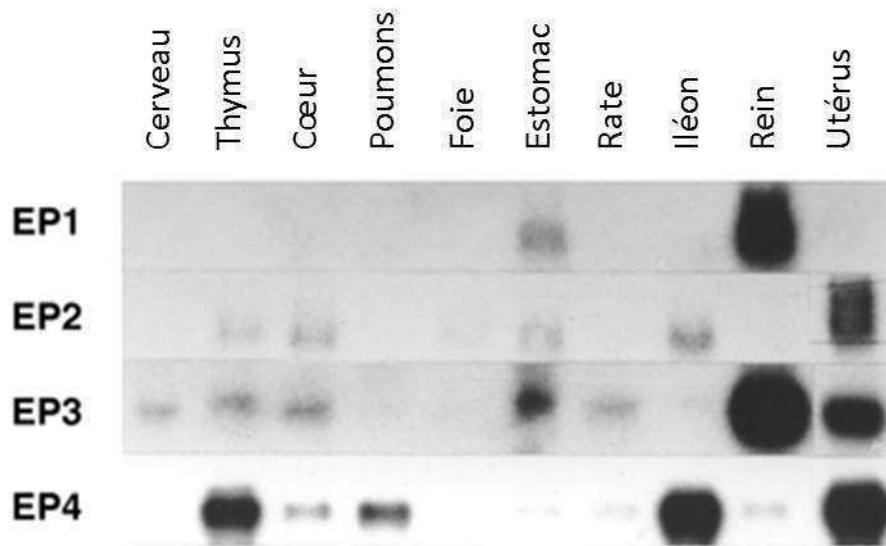


Figure 28: Northern Blot représentant la distribution des récepteurs de la PGE2 dans les tissus de l'organisme. (Adapté de Sugimoto and Narumiya, 2007).

Chez l'homme, au niveau intestinal, peu de données sont disponibles concernant l'expression des EP. Cependant, une expression des récepteurs EP1 à EP4 a été rapportée dans le tube digestif de diverses espèces et par diverses cellules du tractus gastro-intestinal (Cosnes et al., 2011; Takafuji et al., 2000). La distribution importante des récepteurs EP au niveau intestinal s'illustre d'ailleurs par le large champ d'actions de la PGE2 rapporté dans un paragraphe ci-après. Enfin, de façon intéressante, les récepteurs EP sont également exprimés par les composants du SNE (Grasa et al., 2006; Morimoto et al., 1997; Northey et al., 2000).

(2) Récepteurs de la prostaglandine D2

✓ Récepteurs membranaires

Les actions de la PGD2 sont médiées par les récepteurs prostanoides de type D (Pettipher, 2008). On distingue deux types de récepteurs, DP1 et DP2 ou CRTH2 (*chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells*) (Figure 29). Selon le type cellulaire, les effets de la transduction du signal PGD2 via l'activation de ces deux récepteurs peuvent être synergiques ou antagonistes (Hata and Breyer, 2004). Ces 2 récepteurs font partie de la

grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils en possèdent donc les caractéristiques principales, soit 7 domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale et trois boucles extracellulaires pouvant être glycosylées ainsi que trois boucles et une extrémité C-terminale intracellulaires qui possèdent des sites potentiels de phosphorylations et d'interactions avec les protéines impliquées dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G.

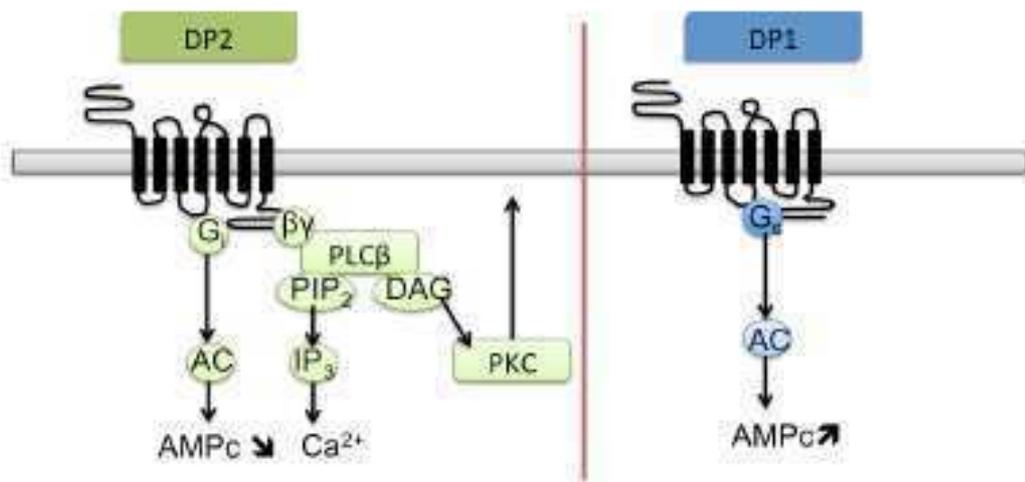


Figure 29 : Représentation schématique des récepteurs prostanoides de type D et leurs voies de signalisation. (D'après Townley and Agrawal, 2012).

- Le récepteur DP1

Le récepteur DP1 est couplé à la protéine G_s. Son activation induit la production du second messenger AMPc stimulant la voie de la PKA et induit également un flux calcique entrant (Boie et al., 1995). Le récepteur DP1 humain lie la PGD2 et la PGJ2 (métabolite de PGD2) avec une haute affinité (Hirai et al., 2001; Wright et al., 2000). Chez l'homme et les rongeurs, DP1 est principalement exprimé par les leucocytes intervenant dans l'inflammation et la réaction allergique, à savoir les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles, les lymphocytes Th2 et les cellules dendritiques. Une expression par les cellules épithéliales des voies respiratoires, par l'endothélium vasculaire ou encore les cellules caliciformes du côlon a également été rapportée (Claar et al., 2015; Matsuoka and Narumiya, 2007). Chez la souris, DP1 est aussi exprimée dans le placenta et les testicules (Rossitto et al., 2015) et des transcrits d'ARNm

ont été détectés dans les méninges, le thalamus, l'hippocampe, le cervelet, le tronc cérébral et la rétine (Boie et al., 1995; Yagami et al., 2016).

- Le récepteur DP2

Le récepteur CRTH2 ou DP2 a été initialement identifié comme un récepteur de surface chimiotactique spécifique des cellules Th2, et par la suite, des études ont démontré sa liaison à la PGD2 avec une affinité similaire à DP1. DP2 est également constitué de sept domaines transmembranaires, et est couplé à la protéine Gi. L'activation de DP2 induit l'inhibition de l'AMPc et augmente le niveau intracellulaire de Ca²⁺ (Hirai et al., 2001). Il présente peu de similitude avec DP1 et les autres récepteurs des prostanoïdes en dehors du fait que la PGD2 s'y lie. Le récepteur DP2 humain possède deux sites de N-glycosylation sur son domaine extracellulaire N-terminal, et une longue queue cytosolique.

Parmi les ligands de DP2 on note, de puissants agonistes sélectifs comme le 13, 15-dihydro-15-keto-PGD2 (DK-PGD2), 15-R-méthyl-PGD2 (R-PGD2), et l'indométacine. De plus, la PGJ2 (métabolite de PGD2) est aussi connu comme ligand de DP2 (Hata and Breyer, 2004; Narumiya et al., 1999).

L'expression de DP2 a été identifiée dans plusieurs tissus tels que le système nerveux central, le cœur, l'estomac, le foie, le petit intestin (Nagata and Hirai, 2003). DP2 est également exprimé par les leucocytes intervenant dans l'inflammation et la réaction allergique tels que les lymphocytes Th2, les éosinophiles, basophiles et monocytes pour lesquels il joue un rôle important au niveau du chimiotactisme (Sturm et al., 2014).

- ✓ Récepteur nucléaire : PPAR γ

La PGD2 est également un ligand du récepteur nucléaire PPAR γ . En effet, la 15d-PGJ2, son principal dérivé, est le principal ligand naturel de PPAR γ (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995). Ainsi, une partie des fonctions de la 15d-PGJ2 serait médiée par l'activation de PPAR γ .

PPAR γ est un membre de la superfamille des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPARs). Trois isoformes de PPAR ont été identifiées : PPAR γ , PPAR α et PPAR β (Berger and Moller, 2002). Il joue un rôle important dans plusieurs phénomènes comme la régulation de la prolifération des adipocytes, de l'inflammation, de l'homéostasie du glucose (Lefebvre et al., 1999).

Le côlon et le tissu adipeux sont les 2 tissus exprimant fortement PPAR γ . Des niveaux intermédiaires de PPAR γ sont retrouvés dans les reins, le foie, la peau, l'intestin grêle, le pancréas et les macrophages (Dubuquoy et al., 2000). En ce qui concerne le côlon, ce sont les cellules épithéliales coliques différenciées, faisant face à la lumière du tube digestif qui l'expriment le plus fortement (Figure 30). Il a également été mis en évidence une expression croissante de PPAR γ , du segment colique proximal vers le segment distal (Lefebvre et al., 1999).

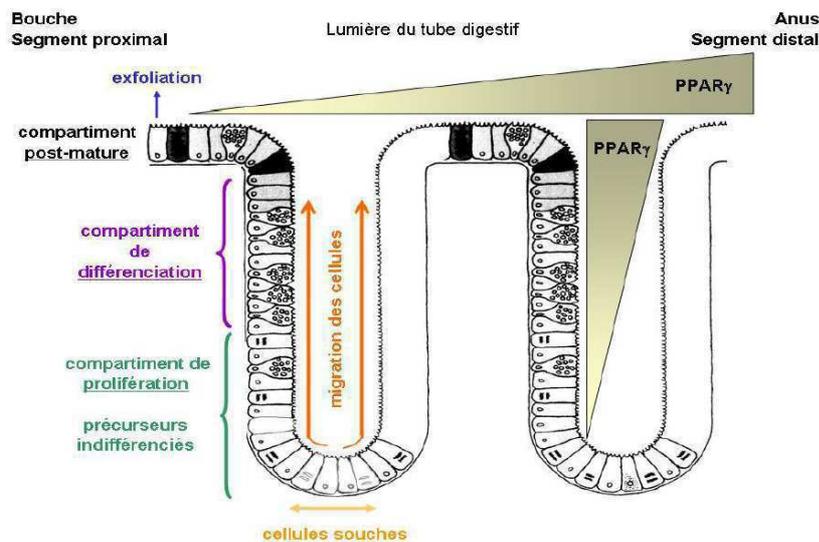


Figure 30: Schéma d'une villosité colique, expression de PPAR γ dans les cellules épithéliales (Potten, 1997)

Les ligands de PPAR γ sont très divers et peuvent être de différentes natures. On distingue ses ligands naturels, dont font partie de nombreux acides gras et des dérivés d'eicosanoïdes et ses ligands synthétiques, dont font partie les glitazones (Spiegelman, 1998). Après fixation de ses ligands, PPAR γ forme alors un hétérodimère avec les *Retinoid X Receptor* (RXRs) et se lie

à des séquences spécifiques situées dans les régions régulatrices de leurs gènes cible, nommées PPAR *Response Elements* (PPREs). Les récepteurs nucléaires interagissent alors avec des protéines corégulatrices pour moduler la transcription de leurs gènes cibles (Tugwood et al., 1992).

Ainsi, PPAR γ est capable de réguler des voies de signalisation de l'inflammation en agissant sur des kinases et des facteurs de transcription comme NF κ B, c-jun, c-fos, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*) et en inhibant la production de cytokines proinflammatoires (IL1 β , TNF α , IFN γ), de chimiokines, ainsi que la prolifération et l'expression de certaines molécules d'adhésion (VCAM-1) (Desreumaux et al., 2001; Yang et al., 2000).

✓ Fonctions connues de DP1 et DP2

La PGD2 induit des effets différents selon le type de tissus où elle est synthétisée. Il lui est attribué des effets à la fois pro- et anti-inflammatoires en fonction du récepteur activé. Le récepteur DP1 est impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative et son activation semble largement être responsable des effets anti-inflammatoires de la PGD2 (Hammad et al., 2007). Le récepteur DP2 est, quant à lui, impliqué dans la promotion de la réaction allergique (Fujitani et al., 2002). Leur rôle sur l'homéostasie de la BEI n'a pas encore été décrypté. Les effets connus de la PGD2 *via* DP1 et DP2 sont répertoriés dans le tableau 6.

Tableau 6: Effets biologiques de la PGD2 via chacun de ses récepteurs membranaires (Adapté de Hata and Breyer, 2004; Kostenis and Ulven, 2006; Narumiya et al., 1999)

Type de Récepteur	Effets biologiques
DP1	<p>Vasodilatation et relaxation des muscles lisses</p> <p>Inhibition de l'agrégation plaquettaire</p> <p>Effets anti-inflammatoires</p> <p>Promotion de l'asthme</p> <p>Inhibition de la migration des éosinophiles et des cellules dendritiques</p> <p>Inhibition de l'apoptose des éosinophiles</p> <p>Induction du sommeil</p> <p>Neuroprotection</p>
DP2	<p>Induction de la migration des cellules Th2, éosinophiles, basophiles</p> <p>Régulation des molécules d'adhésion des cellules Th2 et éosinophiles</p> <p>Activation des éosinophiles</p> <p>Promotion de la production des cytokines par les cellules Th2.</p>

c) Rôles des prostaglandines D2 et E2 dans les MICI

Dès 1977, il a été évoqué que les PGs pourraient être impliquées dans la pathogénèse des MICI (Gould et al., 1977). Cependant, la synthèse de certaines PGs accompagnant l'inflammation semble également bénéfique puisque les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibant la synthèse de PGs sont connus pour exacerber ou réactiver les MICI (Kaufmann and Taubin, 1987; Wallace, 1992). Les effets « cytoprotecteurs » des PGs au niveau du duodénum et de l'estomac ont été décrits par Robert et ses collègues dès 1979. Ce sont des puissants inhibiteurs de la sécrétion d'acide gastrique, et des doses faibles de PGs semblent protéger la

muqueuse lors d'agression sur modèles expérimentaux (Roberts et al., 1997). Le premier analogue de PG à avoir été mis sur le marché est le misoprolol, un dérivé de la PGE1. Il a permis de réduire l'incidence des ulcères gastriques induits par les AINS mais seulement à des doses supprimant l'acidité gastrique (Graham et al., 1988).

Nous aborderons ici les effets connues de la PGE2 et la PGD2 dans l'homéostasie du TD. En effet, les données de la littérature suggèrent au cours des MICI, une synthèse importante de PGE2 dans la phase aiguë de l'inflammation. La production de PGD2 serait, quant à elle, plus modérée et plus tardive mais persistante (Ajuebor et al., 2000; Masoodi et al., 2013; Sturm et al., 2014; Vong et al., 2010; Zamuner et al., 2005).

(1) *La prostaglandine E2*

La PGE2 est plutôt décrite comme étant une PG pro-inflammatoire. En effet, il a été montré une augmentation des concentrations de PGE2 et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans des biopsies coliques de patients atteints de MC ou de RCH (Sharon et al., 1978). Ces augmentations ne sont pas retrouvées dans les biopsies de RCH en rémission (Vong et al., 2010). Ainsi, les concentrations des métabolites de la PGE2 pourrait être des biomarqueurs intéressants dans le suivi des MICI (Arai et al., 2016). De plus, l'impact délétère de la production de PGE2 sur la BEI a déjà été en partie décrypté. Il est lié à l'activation de ses récepteurs EP1 et EP4, entraînant une rupture d'intégrité de la BEI (Martin-Venegas et al., 2006; Rodriguez-Lagunas et al., 2010). La PGE2 jouerait également un rôle dans le développement des cancers colorectaux *via* l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'angiogenèse et dans la progression tumorale (Greenhough et al., 2009; Wang and Dubois, 2006).

Néanmoins, la PGE2 est également nécessaire à l'homéostasie de la BEI en dehors d'un processus inflammatoire (Martin-Venegas et al., 2006) et des effets protecteurs lui ont été largement attribués (figure 31). La PGE2 est connue pour avoir un rôle bénéfique dans sur la prolifération cellulaire, la cicatrisation, ainsi que pour inhiber l'apoptose et promouvoir l'angiogénèse (Iizuka and Konno, 2011; Wang et al., 2005a). Dans ce sens, une sensibilité accrue à développer une colite suite à un traitement au Dextran Sulfate de Sodium (DSS) a été

montré chez des souris déficientes en mPGES1 (Hara et al., 2010; Montrose et al., 2015). Les effets bénéfiques peuvent aussi être en partie attribués à la stimulation de la sécrétion de mucines *via* EP4 (Belley and Chadee, 1999; Willemsen et al., 2003) ou de bicarbonates au niveau du duodénum par l'activation de ses récepteurs EP3 et EP4, protégeant ainsi de l'acidité gastrique (Takeuchi et al., 2010a). De plus, la PGE2 a un effet relaxant sur le muscle circulaire du côlon *via* ses récepteurs EP2 et EP4 (Martinez-Cutillas et al., 2014), tandis que la contraction musculaire lisse est augmentée *via* le récepteur EP1 (Chan and Mashimo, 2013). Un analogue de la PGE1, le lubiprostone est d'ailleurs proposé en traitement de la constipation dans le syndrome du côlon irritable (Owen, 2008) ainsi que pour la constipation induite par les opioïdes (Jamal et al., 2015). D'autre part, les antagonistes des récepteurs EP2 et EP4 ont été utilisés pour supprimer la diarrhée (Satitsri et al., 2016).

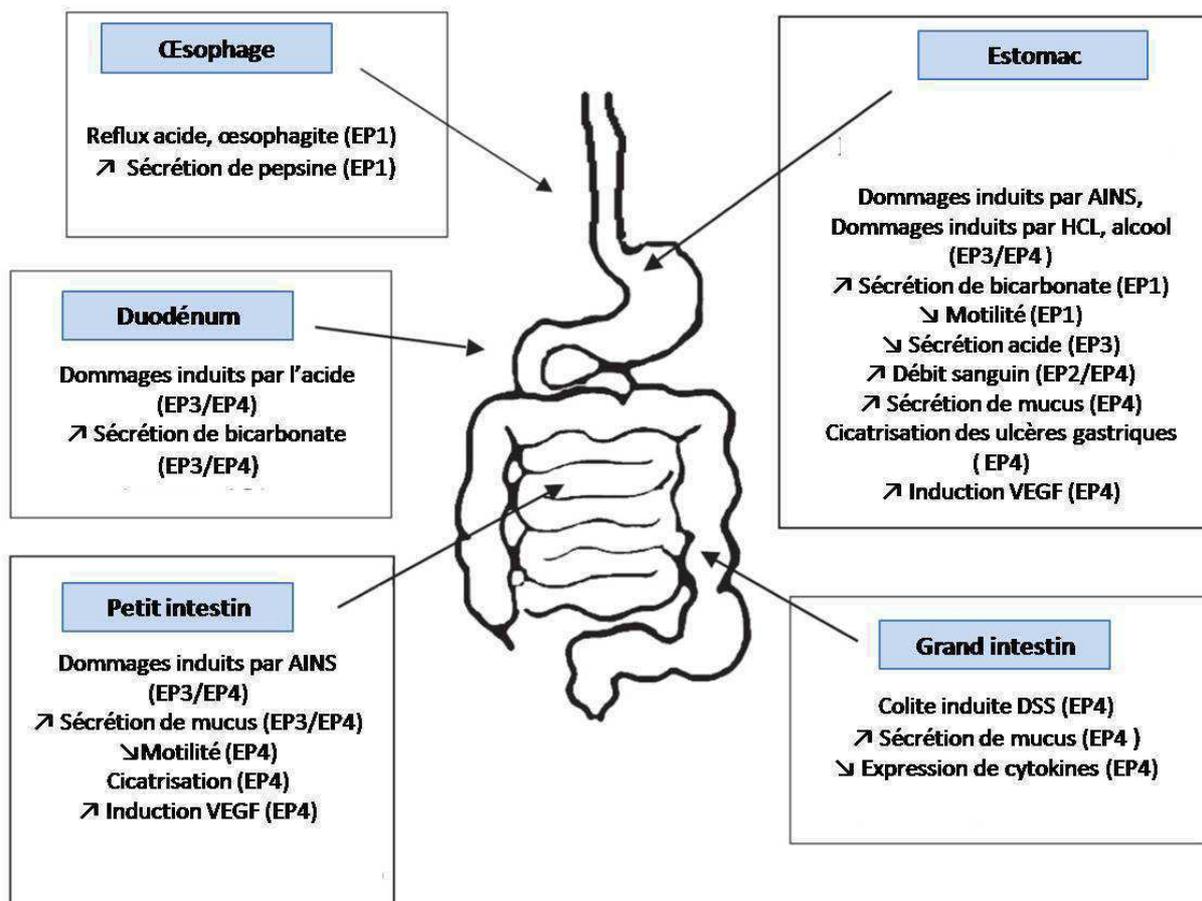


Figure 31: Sous-types de récepteur EP impliqués dans les actions protectrices et cicatrisantes de la PGE2 dans le tractus gastro-intestinal. (Adapté de Takeuchi et al., 2010b))

(2) *La prostaglandine D2*

Le versant anti-inflammatoire de la PGD2 a été décrit dans un modèle de pleurésie chez le rat (Gilroy et al., 2003). Il peut être en partie attribué à son produit de déshydratation, la 15-dPGJ2, principal ligand naturel de PPAR γ , dont l'activation conduit, entre autres, à une inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires (Jiang et al., 1998). Plusieurs arguments sont également en faveur d'un impact bénéfique de la production de PGD2 au cours des MICI (Wallace, 2018).

Sur modèle expérimental de colite TNBS chez le rat, il a été montré que la PGD2 produite par l'HPGDS conduit à une diminution de l'infiltrat granulocytaire dans la muqueuse colique alors que l'inhibition sélective de COX2 conduit à une augmentation marquée de l'infiltration des granulocytes dans la muqueuse. Ce versant anti-inflammatoire de la PGD2 serait médiée *via* son récepteur DP1 (Ajuebor et al., 2000; Alhouayek et al., 2018; Iwanaga et al., 2014; Li et al., 2017; Sturm et al., 2014). En effet, l'infiltration granulocytaire est réduite par l'administration de PGD2 ou d'un agoniste du récepteur DP1 (Ajuebor et al., 2000). Une des hypothèses actuelles est que l'activation de la voie HPGDS/PGD2 inhiberait en partie les effets délétères de la production de TNF α (Iwanaga et al., 2014).

Sur modèles expérimentaux de colite chez le rat, l'augmentation marquée et persistante de la PGD2 semble en lien avec la phase de résolution de la colite (Ajuebor et al., 2000; Zamuner et al., 2003). Zamuner et son équipe ont montré qu'elle s'accompagne de changements significatifs des fonctions épithéliales du côlon avec notamment une activité sécrétoire (canaux chlorures) diminuée. Cette dernière se normalise lors de l'administration d'un inhibiteur sélectif de la COX2 (célécoxib), mais pas avec un inhibiteur sélectif de la COX1 (SC-560). De plus, elle est reproduite dans le tissu colique normal par une exposition à la PGD2, mais pas à son métabolite, le 15d-PGJ2. Ainsi, leurs travaux soulignent le rôle important de la PGD2 *via* COX-2, dans la cicatrisation de la BEI et la fonction sécrétoire épithéliale (Zamuner et al., 2003).

Des données sur biopsies coliques humaines confortent également le rôle anti-inflammatoire de la PGD2 dans les MICI, et en particulier dans le maintien de la rémission de ces pathologies (Vong et al., 2010). Vong et ses collègues ont étudié sur biopsies coliques humaines la

production de la PGE2 et la PGD2 ainsi que l'expression des principales enzymes de synthèse et des principaux récepteurs. Trois groupes ont été comparés, à savoir : sujets sains sans antécédents de RCH, sujets sains en rémission clinique depuis au moins 4 ans et sujets en phase active de RCH. Ils ont montré au niveau transcriptionnel une surexpression de DP1 associée à une augmentation de la production de PGD2 chez les patients en rémission par rapport aux sujets en phase active et aux témoins. La PGD2 se liant préférentiellement à DP1 et son activation étant largement considérée comme responsable des effets anti-inflammatoires de la PGD2, ces données suggèrent que la PGD2 jouerait un rôle dans la résolution du processus inflammatoire et le maintien en rémission (Vong et al., 2010). Une étude toute récente objectivant une rémission clinique *via* l'activation de la voie DP1 chez des patients présentant une RCH modérée vient conforter ces données (Li et al., 2017). Enfin, dans le cadre de gastrites à *Helicobacter Pylori*, il a été montré une association entre la diminution de l'expression de la LPGDS et la sévérité de la gastrite évoquant un rôle protecteur de la PGD2 (Hokari et al., 2009).

A l'inverse, d'autres travaux évoquent un rôle délétère de la PGD2 sur la BEI. Par exemple, une inactivation de la LPGDS sur souris traitées par DSS entraîne une diminution des dommages histologiques (Hokari et al., 2011). De la même façon, dans un modèle de rat TNBS-AOM, l'expression de la HPGHS et de COX2 est augmentée et l'utilisation d'antagoniste de DP1 réduit le développement de cryptes aberrantes (Zamuner et al., 2005). La dualité du rôle de la PGD2 a aussi été évoquée dans d'autres modèles comme la dermatite (Sarashina et al., 2014).

Ainsi, si les effets protecteurs de la PGD2 semblent liés au récepteur DP1, les effets pro-inflammatoires semblent quant à eux liés à DP2. Il existe une corrélation entre leur expression et la sévérité de la colite (Sturm et al., 2014).

Dans l'ensemble de ces études, l'aspect mécanistique n'a pas été abordé. En ce qui concerne DP1 et DP2, quelques voies de signalisations spécifiques ont déjà été décryptées, notamment une voie DP1 dépendante impliquée dans l'induction de l'expression de la mucine MUC5B (Choi et al., 2011). Une augmentation de l'expression de mucines MUC2 et MUC5AC *via* DP1 a également été mise en évidence sur la lignée de CEI à caractère muco-sécrétoire, la LS174T (Wright et al., 2000). La fonction principale des mucines étant de former un gel de mucus protégeant la muqueuse colique (Hansson, 2012), le rôle bénéfique de la PGD2 dans

les MICI pourrait être lié à l'augmentation de leur sécrétion par l'activation de DP1. De plus, il a été montré que les mucines MUC5AC et MUC2 sont impliquées dans la réparation épithéliale au cours des MICI en agissant sur la différenciation et la croissance cellulaire (Buisine et al., 2001; Velcich et al., 2002). Plusieurs études récentes sur modèle de colite induite soulignent également les effets bénéfiques de la voie PGD2/DP1. L'activation de la voie PGD2/DP1 par la niacine serait responsable d'une amélioration de la perméabilité vasculaire, d'une réduction de l'apoptose des CEI ainsi qu'une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Li et al., 2017). D'autres études ont montré que l'activation de la voie DP1 protège d'une colite chimiquement induite (Cuzzocrea et al., 2003; Iwanaga et al., 2014; Li et al., 2017). L'effet protecteur serait en partie lié à l'inhibition des effets du TNF- α sur la BEI (Iwanaga et al., 2014). Enfin, l'activation de DP1 stimule la production d'IL10 par les cellules dendritiques, cytokine connue pour ses effets anti-inflammatoires dans la colite (Hammad et al., 2007; Li et al., 2017).

Objectifs de l'étude

L'UNGE est une unité fonctionnelle, pluricellulaire regroupant les CEI, les neurones et les CGE. Les neurones et les CGE constituent un réseau distribué le long du tractus digestif, le SNE. Ce dernier intervient dans la régulation des fonctions et le contrôle de l'homéostasie de la BEI selon un mode paracrine, notamment *via* la sécrétion par les CGE et les neurones de médiateurs solubles (Neunlist et al., 2007). Le fonctionnement de l'UNGE est probablement modifié lors de pathologies intestinales, et l'hypothèse de l'implication du SNE dans la physiopathologie des MICI n'est pas exclue. En effet, si le SNE a tout d'abord été considéré comme une cible de l'inflammation, plusieurs études suggèrent que les composants du SNE participeraient directement à la réponse inflammatoire.

Des travaux au sein de l'unité ont démontré la capacité des CGE à sécréter une nouvelle classe de médiateurs solubles, les PGs. Ainsi, la 15d-PGJ2 et le 11 β PGF2 α , dérivés de la PGD2 et sécrétés par le SNE, joueraient un rôle dans l'homéostasie de la BEI. La 15d-PGJ2 module la prolifération et la différenciation des CEI *via* l'activation de PPAR γ (Bach-Ngohou et al., 2010). Le 11 β PGF2 α , serait quant à lui impliqué dans la réparation épithéliale (Coquenlorge et al., 2016). De plus, des études lipidomiques récentes ont montré une diminution de la production de ces deux médiateurs gliaux dans la MC (Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016). Ainsi, une altération de leur production pourrait être un des éléments de la physiopathologie des MICI.

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la relation paracrine impliquant la PGD2 et la PGE2 au sein de l'UNGE. En effet, dans les différentes études menées, ces médiateurs lipidiques semblent à la fois impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI et dans la participation à sa rupture en situation inflammatoire. De façon schématique, la voie de la PGD2 serait plutôt anti-inflammatoire alors que celle de la PGE2 serait à l'inverse pro-inflammatoire. Enfin, si l'effet de la PGE2 sur la BEI a déjà été en partie évalué, l'impact bénéfique ou délétère de la production de PGD2 sur la BEI n'a pas été encore caractérisé.

Objectifs de l'étude

Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse étaient :

- d'étudier les voies de synthèse de la PGD2 et la PGE2 au sein du SNE, en conditions physiologique et inflammatoire,
- d'étudier si les voies de synthèse de la PGD2 et de la PGE2 sont modulées dans la MC, suggérant l'implication de ces deux médiateurs dans la physiopathologie des MICI,
- d'étudier l'impact bénéfique ou délétère de la PGD2 sur la BEI par la caractérisation de voies de signalisations activées, de gènes cibles ou de fonctions régulées.

Ce travail de thèse est présenté sous la forme de deux articles et d'une étude transcriptomique. Les deux articles reprennent les travaux réalisés sur la caractérisation des voies métaboliques de la PGD2 et de la PGE2 ainsi que leurs modulations en condition inflammatoire, plus particulièrement dans le contexte de la MC. Le premier article, rassemblant les résultats obtenus sur la voie métabolique de la PGD2, a été publié dans *Intestinal Bowel Disease* en 2015. Le deuxième article, portant sur les résultats obtenus sur la voie de la PGE2 a été soumis pour publication dans la revue *Molecular Medicine Reports*. Ces travaux confirment l'implication de la voie de la PGD2 et celle de la PGE2 dans la physiopathologie de la MC et éclaire sur l'origine de cette production en condition inflammatoire. Ces données s'accordent avec la place que joue le SNE dans la physiopathologie des MICI.

L'analyse transcriptomique pan-génomique a été réalisée à partir d'explants de muqueuse colique humaine normale dans le but d'étudier les voies de signalisations activées, de gènes cibles ou de fonctions régulées par la PGD2 sur la BEI.

Par ailleurs, une revue sur la dualité des effets de la PGD2 sur l'homéostasie de la BEI a été publiée dans *Médecine Sciences* en 2015 et est présentée en annexe 1. Il s'agit d'une synthèse des données actuelles concernant le rôle complexe de la PGD2 dans la physiopathologie des

Objectifs de l'étude

MICI, à laquelle nous avons apporté par nos résultats (production de la PGD2 par le SNE) un éclairage sur l'origine de la PGD2.

Article I :

Activation de la voie de la prostaglandine D2

dans la maladie de Crohn :

Implication du système nerveux entérique

Présentation de l'article 1 :

La PGD2 et ses dérivés, tels que la 15d-PGJ2 et le 11 β PGF2 α , sont des médiateurs lipidiques participant à l'homéostasie de la BEI, *via* les voies PPAR γ et DP2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016). Néanmoins, plusieurs études mettent en relief une dualité de la PGD2 quant à un rôle anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire. L'implication de la PGD2 dans la physiopathologie des MICI reste également actuellement débattue. En effet, deux études réalisées sur biopsies coliques de patients présentant une RCH lui attribue un rôle contradictoire. L'équipe de Vong a montré une surexpression de DP1 associée à une augmentation de la production de PGD2 chez les patients en rémission par rapport aux patients en phase active de la maladie, et suggère que la PGD2 jouerait un rôle dans la résolution du processus inflammatoire et le maintien en rémission au cours des RCH *via* ce même récepteur DP1 (Vong et al., 2010). A l'inverse, l'équipe d'Hokari a montré une augmentation de l'expression de la LPGDS, corrélée à la sévérité de la maladie (Hokari et al., 2011). A notre connaissance, si la voie de la PGD2 a été explorée en partie dans la RCH, aucune donnée sur la MC n'a été publiée.

D'autre part, s'il a été démontré que les CGE sont impliquées dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI *via* les dérivés de la PGD2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016), la capacité du SNE à produire la PGD2 en condition inflammatoire n'a pas encore été décrite.

Au regard de ces données, les objectifs étaient :

- 1/ d'étudier la voie de synthèse de la PGD2 et la modulation de sa production dans la MC
- 2/ d'étudier la capacité du SNE à produire la PGD2 en condition inflammatoire.

Dans ce but, nous avons, dans un premier temps, évalué l'expression au niveau transcriptionnel des différents acteurs de synthèse de la PGD2 ainsi que ses récepteurs (COX2, LPGDS, HPGDS, DP1, DP2, PPAR γ) au sein de la muqueuse intestinale de patients atteints d'une MC quiescente ou en phase active, et de patients témoins. Pour les patients en phase active, nous disposons de prélèvements réalisés à la fois en zone ulcérée et en zone saine. Cette analyse transcriptionnelle a mis en relief pour la première fois un profil d'activation complet de la voie synthèse de la PGD2, à savoir cPLA2-COX1-COX2-LPGDS, en zone ulcérée chez les patients présentant une MC active suggérant une production accrue de PGD2 (Figure 2). Des

dosages de PGD2 au sein des biopsies ont donc été réalisés par technique EIA. Notre hypothèse a été confirmée par une augmentation significative de la production de PGD2 chez un même patient présentant une MC active entre la zone saine et la zone ulcérée (Figure 4). Néanmoins, nous avons montré que cette production accrue de PGD2 en zone ulcérée est associée à une diminution de l'expression de la voie PPAR γ (Figure 3).

Dans un deuxième temps, la capacité du SNE à produire de la PGD2 en condition inflammatoire a été évaluée. Tout d'abord, une analyse immunohistochimique sur culture primaire de SNE ainsi que sur plexus sous muqueux et myentérique humain a confirmé l'expression de la LPGDS, enzyme clé de la synthèse de PGD2, à la fois par les neurones entériques et par les CGE (Figure 5 & 6). Puis, sur cultures primaires de SNE d'embryon de rat (Chevalier et al., 2008), nous avons montré qu'en réponse au stress inflammatoire induit par du LPS, le SNE produisait de la PGD2. Cette production est liée à l'induction de la LPGDS puisque elle est inhibée par l'ajout d'un inhibiteur spécifique (AT56). Enfin, grâce à un modèle de coculture neurones/CGE récemment développé au sein de l'unité (Le Berre-Scoul et al., 2017), nous avons montré qu'à la fois les neurones et les CGE participaient à cette production de PGD2 en condition inflammatoire (Figure 7).

Ainsi, notre étude confirme l'implication du micro-environnement de la CEI, et en particulier les neurones entériques et les CGE, dans la production de PGD2 lors d'un processus inflammatoire. Ces cellules disposent de la machinerie moléculaire indispensable à cette production *via* l'expression de la LPGDS. La mise en évidence d'une induction de l'expression de la LPGDS au sein de biopsies faites en zones ulcérées chez des patients atteints d'une MC en phase active associée à une diminution de l'expression de PPAR γ appuie l'hypothèse de l'implication de ces 2 acteurs dans la physiopathologie de la maladie de Crohn.

Cet article a été publié dans *Intestinal Bowel Disease* en 2015.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Activation of the prostaglandin D2 metabolic pathway in Crohn's disease: involvement of the enteric nervous system

Anne-Gaëlle Le Loupp^{1,2,3,4}, Kalyane Bach-Ngohou^{1,2,3,4}, Arnaud Bourreille^{1,2,3,4}, Hélène Boudin^{1,2,3}, Malvyne Rolli-Derkinderen^{1,2,3}, Marc G. Denis^{1,2,3,4}, Michel Neunlist^{1,2,3} and Damien Masson^{1,2,3,4*}

Abstract

Background: Recent works provide evidence of the importance of the prostaglandin D2 (PGD2) metabolic pathway in inflammatory bowel diseases. We investigated the expression of PGD2 metabolic pathway actors in Crohn's disease (CD) and the ability of the enteric nervous system (ENS) to produce PGD2 in inflammatory conditions.

Methods: Expression of key actors involved in the PGD2 metabolic pathway and its receptors was analyzed using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) in colonic mucosal biopsies of patients from three groups: controls, quiescent and active CD patients. To determine the ability of the ENS to secrete PGD2 in proinflammatory conditions, Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) expression by neurons and glial cells was analyzed by immunostaining. PGD2 levels were determined in a medium of primary culture of ENS and neuro-glial coculture model treated by lipopolysaccharide (LPS).

Results: In patients with active CD, inflamed colonic mucosa showed significantly higher COX2 and L-PGDS mRNA expression, and significantly higher PGD2 levels than healthy colonic mucosa. On the contrary, peroxysome proliferator-activated receptor Gamma (PPARG) expression was reduced in inflamed colonic mucosa of CD patients with active disease. Immunostaining showed that L-PGDS was expressed in the neurons of human myenteric and submucosal plexi. A rat ENS primary culture model confirmed this expression. PGD2 levels were significantly increased on primary culture of ENS treated with LPS. This production was abolished by AT-56, a specific competitive L-PGDS inhibitor. The neuro-glial coculture model revealed that each component of the ENS, ECG and neurons, could contribute to PGD2 production.

Conclusions: Our results highlight the activation of the PGD2 metabolic pathway in Crohn's disease. This study supports the hypothesis that in Crohn's disease, enteric neurons and glial cells form a functional unit reacting to inflammation by producing PGD2.

Background

Inflammatory bowel diseases (IBD) are described as multifactorial pathologies with an uncontrolled immune response leading to inflammation in genetically predisposed individuals. IBD etiologies remain unresolved [1, 2]. The role of prostaglandins (PG) in its pathogenesis was first suggested in 1977 [3]. Previous studies have reported high

levels of PGD2 in animal models of colitis [4, 5] and in colonic mucosal biopsies of patients with a history of ulcerative colitis (UC) [6]. PGD2 synthesis is derived from prostaglandin H2 (PGH2) through prostaglandin D synthase (PGDS). PGH2 is derived from arachidonic acid by cyclooxygenases (COX), which exist in two isoforms: COX1 and COX2. COX1 is expressed constitutively in most cell types, whereas COX2 is induced by inflammatory stimuli such as bacterial endotoxin and proinflammatory cytokines. Two distinct PGDS have also been identified: hematopoietic PGDS (HPGDS) and lipocalin-type PGDS (L-PGDS). Similarly to COX2, L-PGDS but

* Correspondence: damien.masson@chu-nantes.fr
¹INSERM Unité 913, 1 rue Gaston Veil, Nantes F-44035, France
²Université Nantes, 1 quai de Tourville, BP 13522, Nantes F-44035, France
 Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Le Loupp et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

not HPGDS is known to be inducible in inflammatory conditions [7, 8]. While overexpression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and the proinflammatory role of PGE2 have been well described in IBD [9], the role of PGD2 in IBD remains debated and there have been no reports on PGD2 in Crohn's Disease (CD). Ajuebor *et al.* demonstrated that PGD2 reduced granulocyte infiltration during experimental colitis [5]. Vong *et al.* reported high levels of PGD2 in the colonic tissue of patients with quiescent CD [6]. Some of the anti-inflammatory properties attributed to PGD2 may be related to the effects of its metabolite, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15dPGJ2), which has been shown to exert potent anti-inflammatory effects in animal models through activation of its receptor PPAR γ [10, 11]. Conversely, Hokari *et al.* suggested that L-PGDS plays a proinflammatory role in the development of colitis in clinical and experimental studies [12]. They reported that the level of L-PGDS mRNA expression was increased in UC patients in parallel with disease activity. However, changes in PGD2 production or in the expression of enzymes involved in its synthesis during CD are currently unknown.

Although immune cells are central producers of cytokines and prostaglandins, the cells of the mucosa are also known to be able to contribute to this production [13]. The ENS is a major constituent of the intestinal mucosal microenvironment. The ENS, composed of enteric neurons and enteric glial cells (EGCs), together with the intestinal epithelial barrier (IEB) is a functional entity, the digestive neuronal-glial-epithelial unit, based on the physical proximity and paracrine relationship between its components [14]. Indeed, the ENS is known to regulate the gut homeostasis process and, in particular, intestinal epithelial barrier functions, *via* the release of various mediators [14]. Recent studies have shown that the ENS is able to sense inflammatory stressors and respond by secreting various cytokines or chemokines [15, 16]. Furthermore, various studies have described abnormalities of the ENS in CD and have suggested a role of the ENS in the pathogenesis of IBD [17–22]. Recently, we have demonstrated that the EGCs of the ENS are involved in controlling intestinal epithelial functions through secretion of 15dPGJ2 [23]. However, the ability of the ENS to produce PGD2 and its modulation by inflammation remains unknown.

Based on these findings, our aims were to investigate expression of key actors of the PGD2 metabolic pathway in colonic mucosal biopsies of patients with CD and to evaluate the ability of the ENS to produce PGD2 in pro-inflammatory conditions.

Methods

Patient selection

Tissue samples were collected from colonic biopsies of patients with CD. Thirty patients with CD treated at the

Department of Gastroenterology (Nantes University Hospital, France) were included in this study. Colonic biopsies were obtained and stored in the bio-collection of the "Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD)". The clinical and demographic data were collected and recorded in a computerized database securely coupled to the biological collection. This bio-collection was approved and registered by the French Ministry of Science and Research "DC-2008-402". CD was diagnosed on the basis of clinical and endoscopic criteria. Fifteen quiescent disease patients and fifteen active disease patients, with acute or chronic inflammation, were included in this study. Two biopsies were collected from patients with active disease, one in an inflamed zone and one in a normal zone. Colonic biopsy specimens from normal mucosa were collected from fifteen patients with colonic polyps and were used as controls. All tissues were processed according to the French Guidelines for Research on Human Tissues (Agence Nationale d'Accréditation 2001). The characteristics of patients included are given in Table 1. After collection, biopsies were immediately immersed in RA1 buffer (Macherey Nagel, Hoerd, France) and stored at -80°C before real-time PCR analysis. Samples intended for PGD2 determination were stored at -80°C until time of use.

For immunofluorescence staining, tissue specimens were collected from patients who underwent surgery for colonic adenocarcinoma (four colonic specimens from two patients were stained). Patients gave their informed and written consent for the biopsy studies. Specimens were taken at a distance from the tumor, in macroscopically and histologically normal areas, and immediately processed in the Pathology Department. According to the guidelines of the French Ethics Committee for Research on Human Tissues, these specimens were considered as "residual tissues", not relevant to pathological diagnosis. Tissue samples were subsequently fixed in 4 % paraformaldehyde for 3 hours at room temperature. Following several washes in phosphate buffer saline (PBS), tissue was pinned and whole mounts of mucosal and submucosal plexus were obtained by microdissection under a microscope SZ3060 (Olympus, Rungis, France), as previously described [24].

Cell culture and treatments

Primary culture of the enteric nervous system

Primary culture of the rat ENS was performed as previously described [25]. Experiments were compliant with journal policies and UK regulations on animal experimentation as described by Drummond [26]. Pregnant Sprague-Dawley rats at stage E15 were purchased (CERJ, Le Genest St Isle, France) and manipulated in compliance with French institutional guidelines. These procedures were approved by the local institutional

Table 1 Clinical characteristics and treatments – Crohn's disease patients at the time of study inclusion. Values are given as the mean (minimum-maximum) for continuous variables and numbers (%) for categorical variables

	Quiescent Crohn's disease	Active Crohn's disease	Controls
Cases	15	15	15
Age, years	36 (18–63)	37 (21–76)	55 (38–76)
Sex: female/male	9/8	11/4	4/11
Age at diagnosis, years	30 (19–60)	26 (15–58)	
Duration of the disease, years	7 (1–21)	12 (1–26)	
Current treatment			
No medication	1 (7 %)	5 (33 %)	
5-ASA/Salazopyrin/Azathioprine	2 (17 %)	2 (17 %)	
Corticosteroids/immunosuppressants	9 (60 %)	6 (40 %)	
Infliximab	8 (53 %)	5 (33 %)	

animal research committee (Certificate E. 44011; Inserm, Nantes, France). Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used. Rats were killed by an overdose of CO₂ followed by severing of the carotid arteries. Intestinal cells obtained after dissection and dissociation were counted and then seeded at a density of 2.4 x 10⁵ cells cm² on 24-well plates (Corning, Avon, France) previously coated with a 0.5 % gelatin solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Primary cultures were maintained for 14 days with half of the medium replaced every day (Dulbecco's modified Eagle medium-F12 1:1 containing 1 % N-2 supplement (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Primary cultures were treated for 24 h with 0.1 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich, Lyon, France) with or without 95 µM AT-56 (provided by Y Urade; Osaka Bioscience Institute) a selective and competitive inhibitor of L-PGDS [27]. Three experiments were performed. The ENS culture media were collected, centrifuged and stored at -80 °C for further analysis. For immunofluorescence staining, primary cultures of rats' ENS were fixed in 4 % paraformaldehyde followed by several washes in phosphate buffer saline (PBS).

Neuro-glial coculture model

First, a glial feeder layer was made up from the enteric glial cell line JUG2 derived from the intestine of 15-day-old rat embryos [28]. Briefly, the enteric glia were plated at a density of 7,500 cells/cm² in a 24-well plate, and maintained for 4 days in DMEM containing 10 % fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 µg/ml streptomycin and 50 UI/ml penicillin. The medium was replaced with serum-free Neurobasal/B27 medium (Gibco) 3 h before neuron culture. Rat enteric neuron

culture was prepared from 15-day-old rat embryos by previously described methods [5], except that the dissociated cells were plated at 175,000 cells/cm² on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1 mg/ml, Sigma) in DMEM high glucose containing 10 % FCS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml streptomycin and 50 UI/ml penicillin. The coverslips were then transferred 3 h later to the wells containing the glial feeder layer and maintained for up to 7 days in Neurobasal/B27 containing 50 µg/ml streptomycin and 50 UI/ml penicillin. This procedure resulted in a culture on the coverslips composed of 82.6 ± 5.5 % of neurons and 10.6 ± 3.6 % of myofibroblasts, while no glial cells were detected (personal observation). This neuro-glial coculture system made it possible to physically separate the enteric neurons and the glial cells in order to examine the response of each cell type to LPS treatment.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from human mucosal biopsies using the Nucleospin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). cDNA was synthesized using standard procedures as previously described [24]. Real-time PCR was performed according to previous reports with some modifications [29]. Primers were designed from the sequence of human cDNAs using the Universal Probe Library assay design center (<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=1>); sequences are reported in Table 2. Amplification conditions of cPLA2-alpha, COX1, COX2, IL1B, TNF-alpha, L-PGDS, HPGDS, D-type prostanoid (DP) receptor 1 and 2 (DP1, DP2), PPARG and MRPS6 templates were optimized for the Rotorgene 3000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR amplifications were performed in duplicate using Light cycler 480 SYBR Green 1 master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. External standard curves were generated with serial 5-fold dilution of cDNA samples prepared with RNA extract from human mucosal biopsies. The relative amount of transcripts was calculated from these standard curves using RotorGene software. Expression of S6 ribosomal proteins as internal controls was analyzed at the same time. For each sample, the ratio between the relative amount of each specific transcript and S6 was calculated to compensate variations in the quantity and quality of starting mRNA.

Immunofluorescence staining

All antibodies were diluted in PBS with 1 mg mL⁻¹ sodium azide, 4 % horse serum and 1 % Triton X-100. Primary cultures of rat ENS, human plexi were incubated with PBS sodium azide horse serum and Triton X-100 followed by incubation with rabbit polyclonal anti-L-PGDS (1:500; Cayman, Spi-Bio, Montigny-le-Bretonneux,

Table 2 Primers for RT-PCR analysis

Gene	Accession number	Species	Primer sequences (5'3')
TNF	NM_000594	Homo-Sapiens	Fw: CGCTCTCTGCTGCTGCACT Rev: ACTGGAGCTGCCCTTCAGCTT
IL1B	NM_000576.2	Homo-Sapiens	Fw: AAAGCTTGGTGATGCTGGTC Rev: GGACATGGAGAACCACTGT
PTGS1 (COX1)	NM_000962.2	Homo-Sapiens	Fw: TCTGTGGTGGACTATGG Rev: GTGGTGGTCCATGTCCTG
PTGS2 (COX2)	NM_000963.2	Homo-Sapiens	Fw: TGGGAAGCCTTCTTAACCTC Rev: TCAGGAAGCTGCTTTTACCTT
PLA2G4A (cPLA2)	NM_024402	Homo-Sapiens	Fw: TGCTACCTACGTTGCTGTCT Rev: TTCTCTGGAAAATCAGGGTGA
PTGDS (L-PGDS)	NM_000954.5	Homo-Sapiens	Fw: AGAAGAAGGCGCGTGTCC Rev: CCACCACGTGACCGGAGTAGG
HPGDS	NM_014485.2	Homo-Sapiens	Fw: GAGAATGGCTTATGGTAACTCTGT Rev: AAAGACCAAAGTGTGGTACTGC
MIP56	NM_001010	Human mouse rat	Fw: CCAAGCTTATTCAGCGTCTGTTCCTCC Rev: CCCTCGAGTCTTCATCTCTTGGC
PTGDR (DP1)	NM_000953	Homo-Sapiens	Fw: CCTGGAGGAGCGGATCA Rev: GCTCCATAGTAAGCGGATAAA
PTGDR2 (DP2)	NM_004778	Homo-Sapiens	Fw: CCTGTGCTCCCTCTGTGC Rev: TCTGGAGACGGCTCACTG
PPA2G	NM_138711.3	Homo-Sapiens	Fw: AAAGTCGTCTTCCCGCTGACCAAA Rev: GATGGCCACCTCTTGCTCTGC

France) or with human polyclonal anti-HPGDS (1:500; Cayman Spi-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France) overnight at 4 °C. After extensive rinsing in PBS, primary culture or human tissues were incubated with donkey anti-Rabbit IgG conjugated with carboxy-methyl-indocyanin (1:500; Beckman Coulter, Roissy, France) and donkey anti-human IgG conjugated with carboxy-methyl-indocyanin (1:500; Molecular Probes) for 3 h at room temperature. After L-PGDS and HPGDS staining, primary culture or human tissues were incubated with goat polyclonal anti-S100β (1:100; Santa-Cruz, Tebu-Bio, Le Perrayen Yveline, France) or with mouse anti-Hu (1:200 Molecular Probes) overnight at 4 °C followed by donkey anti-goat IgG conjugated with alexa Fluor 488 (1:400; Molecular Probes), donkey anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 fluorescent (1:500; Molecular Probes). Following washes, stained samples were observed and acquired with a IX 50 microscope (Olympus).

PGD2 assay

PGD2 levels in colonic mucosal biopsies of CD patients or released from cell culture in incubation medium were determined using the Prostaglandin D2-MOX EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA). For colonic mucosal biopsies, acetone extraction was performed prior to deproteinization and to concentration. Biopsies were ground in 500 µl cold acetone on ice. Precipitated proteins were removed by centrifuging at 3,000 g for 10 minutes. The sample was then evaporated to dryness under a stream of nitrogen gas. Finally, the sample was resuspended in 100 µl buffer and methoximation was performed according to the assay protocol.

Statistical analysis

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

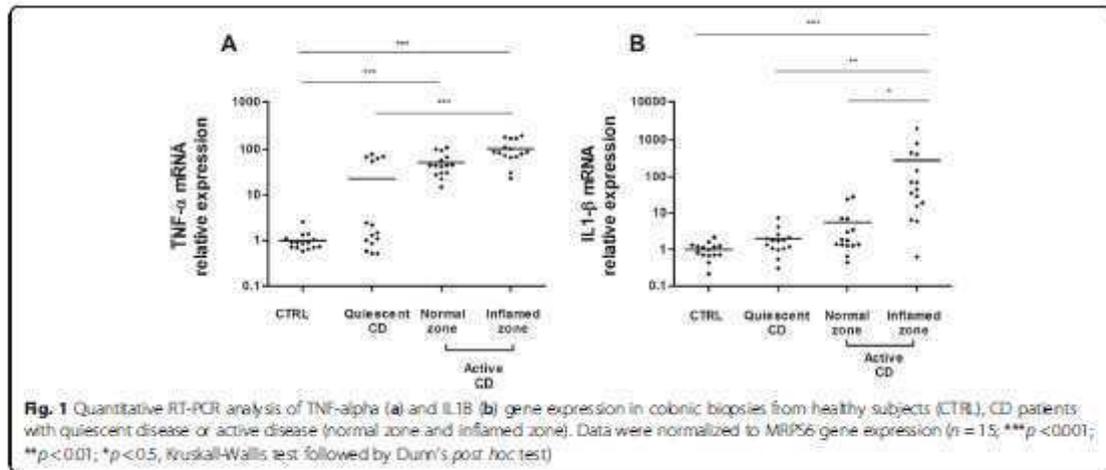
Results

mRNA expression of proinflammatory cytokines is increased in colonic biopsies from patients with active CD

To determine the inflammatory status of the colonic biopsies from different groups of patients, we measured mRNA expression of proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin1,beta (IL1B). TNF-alpha mRNA was significantly increased in patients with active disease compared to healthy subjects and patients with quiescent disease (Fig 1a). Five patients with quiescent disease also presented with an increase in TNF-alpha expression. This transcriptional status was equivalent to that of patients with active CD. This increase was not associated with any relevant clinical characteristics or treatment. IL1B mRNA was significantly increased in sites of intestinal inflammation in patients with active CD compared to the other three groups: controls, biopsies from patients with quiescent disease and from normal mucosa of patients with active CD (Fig 1b).

L-PGDS mRNA expression and PGD2 levels were increased in inflamed colonic mucosa of patients with active CD

We then examined mRNA expression of the five key enzymes involved in PGD2 production and its receptors. Cytoplasmic Phospholipase A2 (cPLA2-alpha) and COX1 were up-regulated in the mucosa of patients with active CD and in the mucosa of five patients with quiescent disease (Fig 2a-b). In patients with active CD, COX2 mRNA expression was significantly increased in the inflamed zone compared to the normal zone (Fig 2c). Colonic expression



of HPGDS in colonic biopsy specimens from patients with quiescent CD did not differ significantly from that of controls (Fig 2d). HPGDS mRNA levels were reduced in the inflamed zone of patients with active CD. L-PGDS mRNA expression was significantly higher in the inflamed colonic mucosa of patients with active CD than in normal mucosa of CD patients or controls (Fig 2e). TNF-alpha mRNA expression was significantly correlated with cPLA2-alpha ($r = 0.8245$; $p < 0.0001$) and COX1 ($r = 0.84$; $p < 0.0001$) expression while IL1B mRNA expression was significantly correlated with COX2 ($r = 0.82$, $p < 0.0001$) and L-PGDS ($r = 0.48$; $p < 0.0001$) expression. Only the inflamed zone in active CD showed total activation of the PGD2 metabolic pathway with up-regulation of cPLA2-alpha, COX1, COX2 and L-PGDS.

We quantified DP1, DP2 and PPARG mRNA expression in the same samples (Fig 3). The colonic expression of DP1 and DP2 in colonic biopsy specimens from patients with CD did not differ significantly from that of controls except for the expression of DP2 which was reduced in inflamed colonic mucosa of CD patients with active disease compared with mucosa of CD patients with quiescent disease (Fig 3a-b). PPARG expression was reduced in inflamed colonic mucosa of CD patients with active disease compared with non-inflamed mucosa of CD patients with active disease; mucosa of CD patients with quiescent disease or control mucosa (Fig 3c).

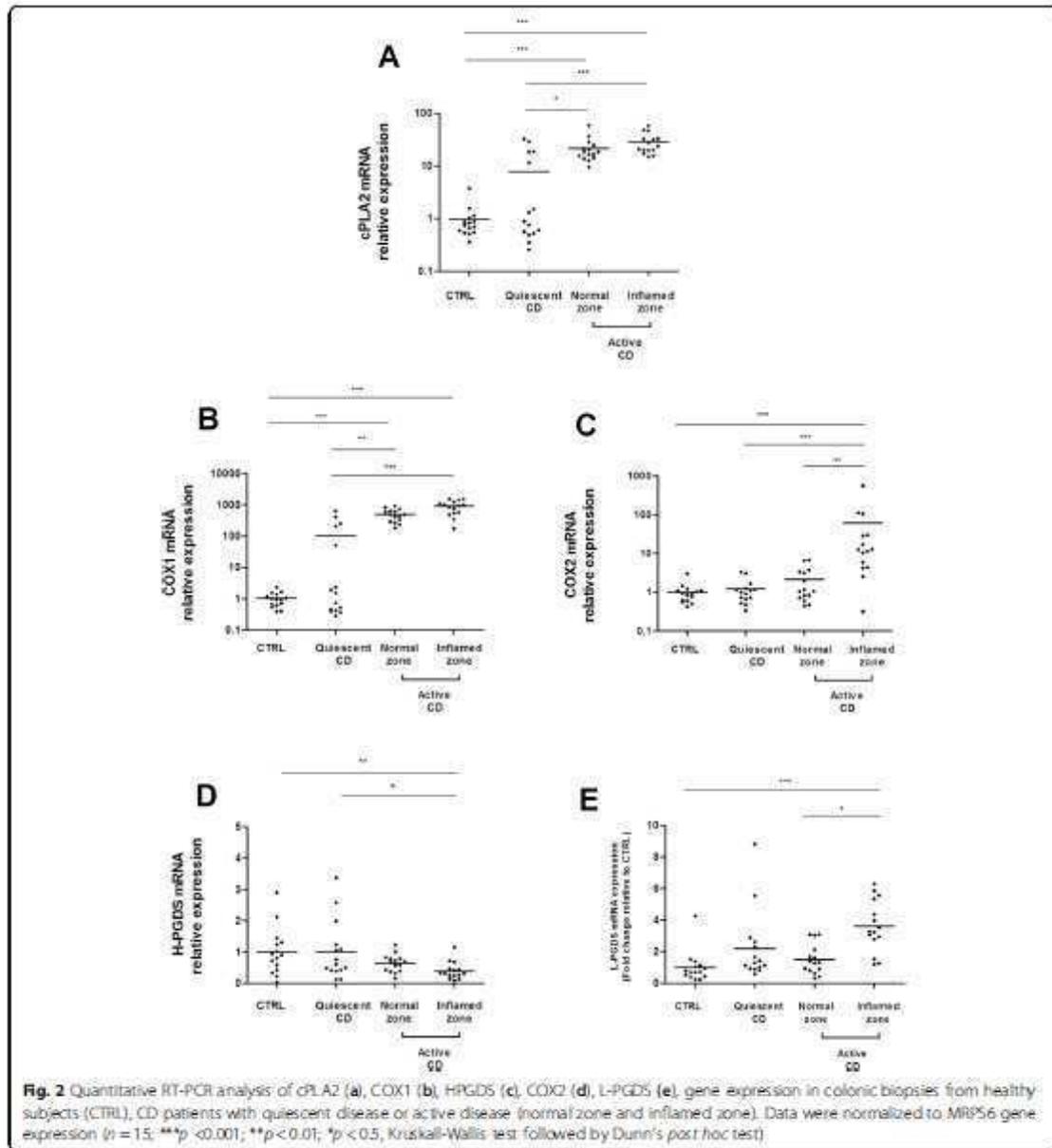
To determine whether activation could lead to higher PGD2 production, we measured PGD2 levels in the colonic biopsies of CD patients. In patients with active CD, PGD2 levels were significantly higher in inflamed colonic mucosa than in normal colonic mucosa (Fig 4).

Neurons of the enteric nervous system express Lipocalin prostaglandin D synthase

L-PGDS expression by EGCs has been previously described [23]. To determine whether enteric neurons could also express L-PGDS, the main enzyme responsible for PGD2 synthesis in inflammatory conditions, we performed L-PGDS immunofluorescence labeling in human myenteric (Fig 5a) and in human submucosal plexi (Fig 5b). Neurons were selectively stained using antibodies directed against the neuronal protein Hu C/D. We found that L-PGDS was expressed in neurons of both human myenteric and submucosal plexi. HPGDS was not expressed by ENS components (data not provided).

ENS produced PGD2 via L-PGDS in proinflammatory conditions

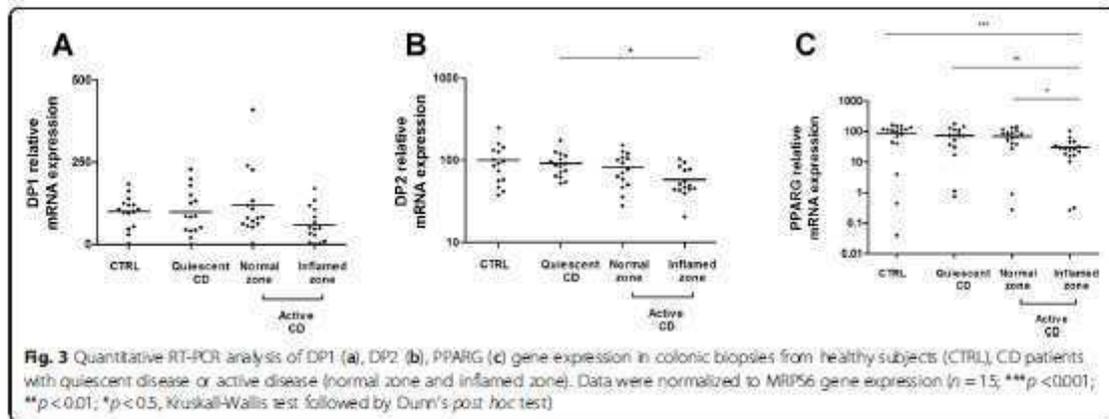
First, L-PGDS expression by glial and neuronal cells in rat ENS primary culture was verified by immunostaining (Fig 6a-b). In contrast, HPGDS was not detected in rat ENS primary culture (data not provided). In order to evaluate the capacity of the ENS to produce PGD2 in proinflammatory conditions, primary cultures were treated for 24 h with LPS without or with AT-56, a specific competitive L-PGDS inhibitor. LPS was used to induce an inflammatory stress. We showed that 1/ the ENS produced PGD2 in response to LPS, and 2/ at the IC50 concentration (95 μ M) AT-56 reduced PGD2 production in response to LPS (Fig 7a). These results confirmed that the ENS is able to produce PGD2 in proinflammatory conditions through L-PGDS. To determine the contribution of neurons and glial cells to the production of PGD2, a neuro-glial coculture model, in which neurons were plated on a glass coverslip suspended above a glia layer, was treated with LPS for 24 h.



LPS treatment of the coculture model induced increased PGD2 production, as observed with ENS primary culture (Fig 7b). After 6 days' co-culture, glial cells and neurons were then separated and treated with LPS for 24 h (Fig 7c-d). We observed increased PGD2 production in isolated neurons and glial cells, suggesting that both enteric neurons and EGCs were able to produce PGD2 in proinflammatory conditions.

Discussion

Our work showed for the first time that there is activation of the entire PGD2 metabolic pathway by increase in mRNA expression of cPLA2-alpha, COX1, COX2 and L-PGDS in the inflamed zone of the colonic mucosa in active CD. Activation leads to increased PGD2 levels in inflamed colonic mucosa. Furthermore, our results showed that the ENS, both cellular components,



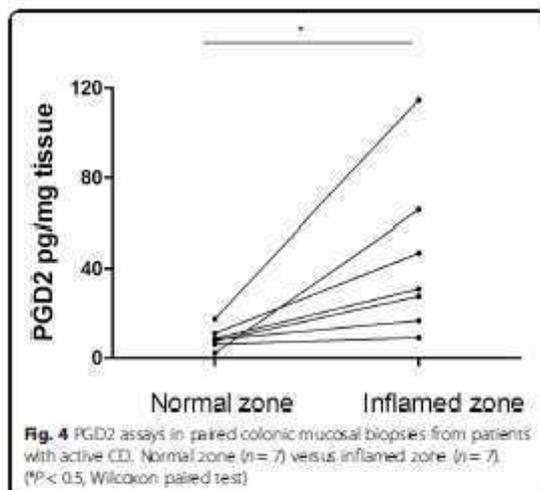
ECG and neurons, can contribute to PGD2 production in response to proinflammatory stress.

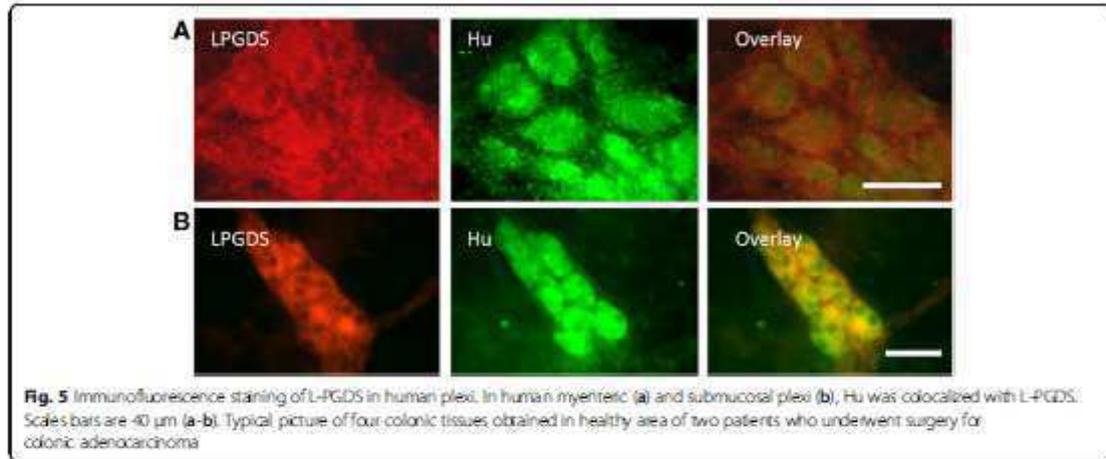
In colonic biopsies of CD patients, we reported two activation profiles respectively associated with TNF-α and IL1B proinflammatory cytokines expression: a total activation profile involving TNF-α, IL1B, cPLA2-α, COX1, COX2 and L-PGDS, and intermediate activation profile, involving TNF-α, cPLA2-α and COX1 observed both in the normal zone of colonic mucosa in active and quiescent CD. This intermediate profile is found in the normal zone of colonic mucosa in the 15 patients with active CD but only in 5 patients with quiescent CD. Among quiescent patients, these five patients did not show any obvious clinical differences from other quiescent patients. These five patients presented a transcriptional status equivalent to that of active CD patients. No histological analysis was done on these colonic biopsy specimens. Such analysis

could clarify this result which could be secondary to the accumulation of inflammatory cells in the tissue. On the other hand, to identify other actors implicated in the signaling pathways involved in these two distinct inflammatory profiles, it would be interesting to compare the transcriptome of patients with active and quiescent CD by performing microarray studies.

Interestingly, COX1 mRNA expression was upregulated in all patients with active CD and in five patients with quiescent CD. COX1 is usually known to be a constitutive enzyme playing physiological roles, not involved in inflammatory responses [30]. However, high expression of COX1 has already been reported in gastric mucosa in inflammatory situations, where COX1-activity was involved in thromboxane A2 (TXA2) synthesis [31]. Hawkey *et al.* have reported increased TXA2 synthesis in non-inflamed rectal mucosa of CD patients [32], suggesting that COX1-TXA2 activation, leading to platelet aggregability and local vasoconstriction, is also of importance in CD. Therefore, COX1 and COX2 are probably both involved in mucosal integrity through different lipid mediators.

In accordance with a previous study [33, 34], we showed up-regulation of IL1B and COX2 expression in the inflamed zone of the colon in patients with active CD. A significant increase in mucosal expression of COX2, the main enzyme responsible for PG production in inflamed mucosa had been already reported [33, 34]. Here, we showed, for the first time, an up-regulation of L-PGDS expression and an increased synthesis of PGD2 in CD. Our data are in keeping with recent results from Hokari *et al.* in UC [12]. They demonstrated that L-PGDS was up-regulated in severely inflamed mucosa and correlated with disease activity, suggesting inflammatory action. The mechanism by which the L-PGDS gene is up-regulated in inflammatory situations is partially described. Fujimori *et al.* demonstrated that L-

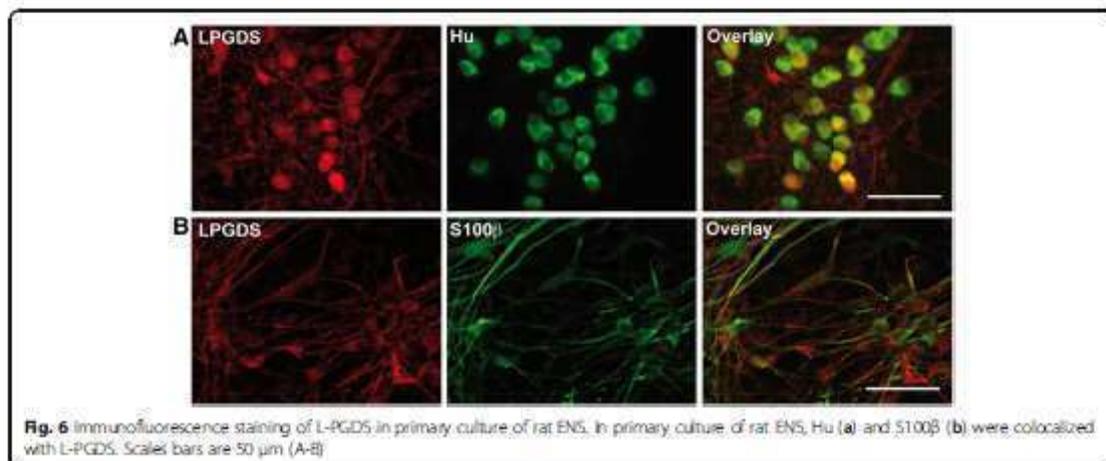


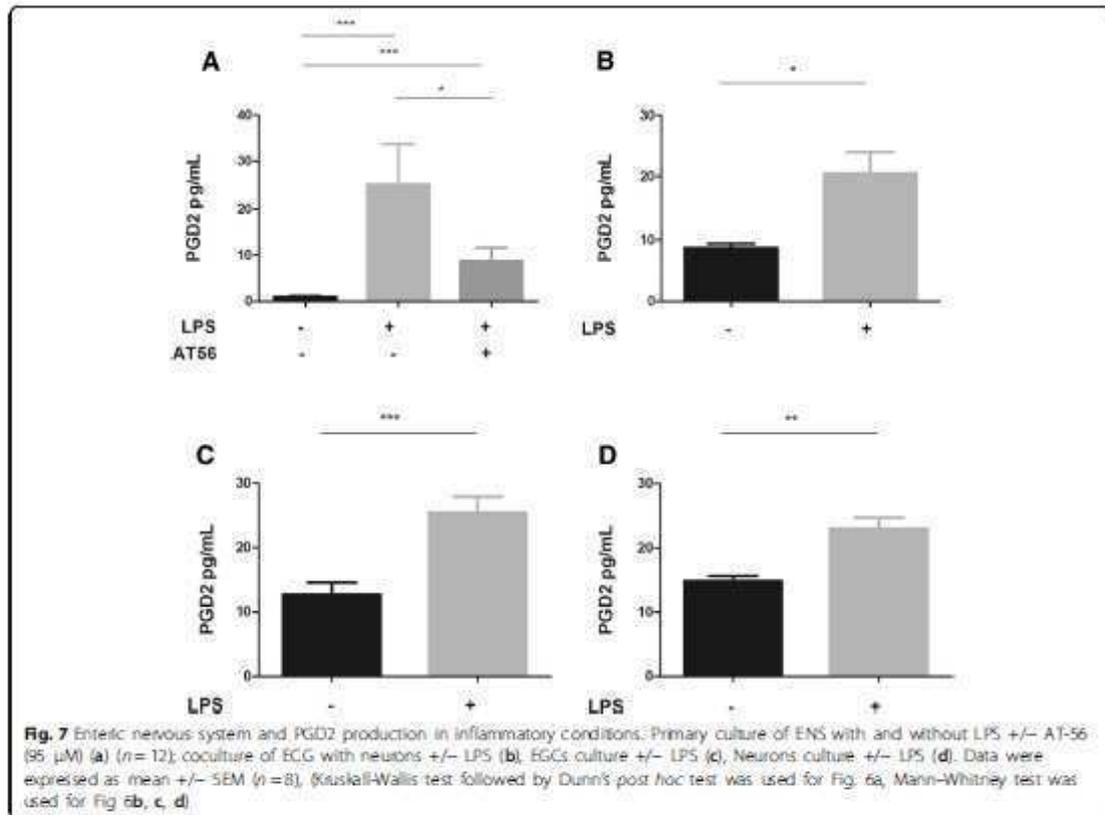


PGDS gene expression is up-regulated by IL-1 β [35]. In rats, two NF-Kappa B elements, present on the L-PGDS gene promoter region, are essential to up-regulation. Conversely, HPGDS expression was not increased in the inflamed mucosa of patients with active disease. In the gut, although HPGS is the most important form of PGDS, expressed by intestinal epithelial cells, mast cells and fibroblasts [7, 36], our data suggests that PGD2 derived from L-PGDS plays a greater role in the pathophysiology of CD.

In our study, we showed that PPARG is down regulated in inflamed colonic mucosa of CD patients with active disease. The colonic expression of the two distinct PGD2 receptors DP1 and DP2 in colonic biopsy specimens from patients with CD did not differ significantly from that in controls except for the expression of DP2 specifically reduced in inflamed colonic mucosa of CD patients with active disease compared with mucosa of

CD patients with quiescent disease. The biological effect of PGD2 on intestinal inflammation remains widely debated. Only, few studies analyzed the role of PGD2 in an intestinal inflammatory process, with opposite roles [5, 6, 37, 38]. Functional duality of PGD2 is probably based on the differential expression in human IBD of the three potential receptors activated by PGD2 or its metabolite, 15dPGJ2. 15dPGJ2 plays an anti-inflammatory or immunomodulatory role through PPARG, which is expressed at high levels in the colonic epithelium. The downregulation of PPARG suggests the inability of 15dPGJ2, PGD2 metabolite, to execute completely its anti-inflammatory effects. The two distinct PGD2 receptors DP1 and DP2 are G protein coupled but signal via different second messengers. Engagement of DP1 results in protein kinase A activation [39] while DP2 acts to raise intracellular calcium levels [40]. PGD2 and 15dPGJ2 are both ligands for DP1 and DP2 [41]. Activation of DP1





leads to beneficial effects. Reduction of granulocyte infiltration through DP1 activation was observed in a colitis model [5]. In colon biopsies of patients with UC, Vong *et al.* reported that PGD2 contributes to maintaining remission in patients. They observed increased PGD2 synthesis and increased DP1 receptor expression [6]. Some studies also showed that DP1 receptor activation stimulates mucin secretion, MUC2 and MUC5AC [42, 43]. The main function of mucins is to protect the colonic mucosa [44]. MUC2 and MUC5AC are involved in epithelial repair in IBD by acting on cell differentiation and growth [45]. The beneficial role of PGD2 in CD may also be attributed to DP1 activation. PGD2 also plays an important role through DP2 activation by down-regulating neutrophil infiltration into the mucosa in acute colitis. In a sepsis mouse model, PGD2 and 15dPGJ2 were significantly increased in peritoneal fluid. Furthermore, COX2 and L-PGDS were up-regulated in the peritoneal exudate cells. In this model, DP2 $-/-$ mice exhibited a significantly higher accumulation of neutrophils into the peritoneal cavity compared with wild type mice [40].

Our study provides evidence on the origin of PGD2 in colitis. Enteric neurons and enteric glial cells are potent modulators of the intestinal epithelial barrier (IEB) and are involved in pathologies associated with altered barrier functions. EGC and neurons produce soluble factors known to regulate intestinal epithelial barrier functions [14, 21, 24, 46]. PGD2 also seems to play a role in this relationship. Previously, we reported that EGCs express L-PGDS and are a cellular source of 15dPGJ2, which regulate epithelial cell proliferation and differentiation via PPAR γ activation [23]. Here, we first demonstrated that enteric neurons express L-PGDS but not HPGDS. Secondly, we showed that neurons and glial cells secrete PGD2 through L-PGDS in proinflammatory conditions. Thus, the ENS is a source of PGD2 in response to inflammatory stress which regulates IEB functions.

These data are consistent with the ENS's involvement in IBD pathogenesis. Altogether, enteric neurons, enteric glial cells and the IEB constitute a functional entity, the digestive neuronal-glial-epithelial unit, based on physical proximity and paracrine relations between its components [14]. The ENS is known to regulate the gut homeostasis

process, and, in particular, intestinal epithelial barrier functions, *via* the release of various mediators [14]. In colitis, epithelial function is impaired, leading to elevated bacterial translocation. In the submucosal plexus, neurons and glial cells expressing Toll-like receptor 4, may participate in an adaptive reaction and may be engaged in the defense responses of the intestinal barrier [47]. This cellular reaction is similar to the proinflammatory process named reactive astrogliosis in the central nervous system (CNS). Immediately after CNS injury, glial cells undergo rapid morphological changes. Interestingly, L-PGDS, which is expressed by glial cells in the central nervous system, participates in reactive gliosis in an autocrine or paracrine manner, and may have pathological implications in neuroinflammatory diseases.

Conclusion

Emerging data suggest that paracrine communication between enteric neurons, glial cells and IEC regulate key functions and is involved in controlling IEB homeostasis. The PGD2 metabolic pathway implicating L-PGDS appears to be activated in Crohn's disease. This study demonstrates that L-PGDS, expressed in intestinal neurons and glial cells, is up-regulated in the inflamed colonic mucosa of patients with active CD. More detailed studies are necessary to elucidate the mechanism relating to involvement of the PGD2 pathway in CD. The next step will be identification of PGD2 targets in the IEB. It may reveal new targeted therapeutic options in CD.

Abbreviations

CD: Crohn's Disease; CNS: Central Nervous System; COX: Cyclooxygenases; cPLA2 α : Cytoplasmic Phospholipase A2; DR: D-type prostanoid; EGCs: Enteric Glial Cells; ENS: Enteric Nervous System; HPGDS: Hematopoietic Prostaglandin D Synthase; IB: Inflammatory bowel diseases; IL1 β : Interleukin 1, beta; L-PGDS: Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase; LPS: Lipopolysaccharide; MRP36: Mitochondrial ribosomal protein S6; PG: Prostaglandin; PGD2: Prostaglandin D2; PGH2: Prostaglandin H2; PGDS: Prostaglandin D Synthase; PLA2G4A: Phospholipase A2, group 4; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma; PTGDR: Prostaglandin D2 Receptor; PTGDR2: Prostaglandin D2 Receptor 2; PTGDS: Prostaglandin D2 synthase; PTGS1: Prostaglandin-endoperoxide synthase 1; PTGS2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2; IEB: Intestinal Epithelial Barrier; qRT-PCR: Quantitative Reverse Polymerase Chain Reaction; TNF α : Tumor Necrosis Factor-alpha; TXA2: Thromboxane A2; UC: Ulcerative Colitis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors approved the article before submission. AGLL, KBN and DM wrote the article. AGLL, KBN and DM analyzed and interpreted the data. AGLL and KBN performed the statistical analysis. AB collected biopsies. HB and MRD participated in discussions and critical revisions of the manuscript. AGLL designed experimental activities and performed the experiments. MGD, MN and DM provided overall supervision for the project.

Authors' information

AGLL, PharmD, KBN, PharmD PhD and DM, PharmD PhD, MGD, PharmD PhD, are specialists in biochemistry. AB, MD PhD, is a medical gastroenterologist.

HB, PhD, MRD, PhD, MN, PhD, are researchers in neurogastroenterology

Acknowledgments

The authors would like to extend their thanks to Muriel Quignard-Lopes, Camille Pana, Julie Joulin and Catherine Le Berse-Souff for their participation in the experiments. The authors also thank Dr. Y Usade who kindly provided AT-56, specific L-PGDS inhibitor. This work was supported by grants from the INSERM (Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale), Nantes University, and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes.

Author details

¹INSERM Unité 913, 1 rue Gaston Weil, Nantes F-44035, France. ²Université Nantes, 1 quai de Tourville, BP 13522, Nantes F-44035, France. ³Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes F-44093, France. ⁴Laboratoire de Biochimie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes F-44093, France.

Received: 23 March 2015 Accepted: 24 August 2015

Published online: 04 September 2015

References

- Guo AY, Steens BW, Wilson RG, Russell DN, Cohen MA, Sturgeon HC, et al. Early life environment and natural history of inflammatory bowel diseases. *BMC Gastroenterol*. 2014;14(1):216.
- Strober W, Fuss L, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514-21.
- Gould SR, Bash AR, Conolly ME. Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet*. 1977;80(8):98.
- Zamuner SR, Warner N, Buret AG, MacNaughton WK, Wallace JL. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut*. 2003;52(12):1714-20.
- Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D2 is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(1):G238-244.
- Vong L, Ferraz JG, Panaccione R, Beck PL, Wallace JL. A pro-resolution mediator, prostaglandin D2, is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):12023-7.
- Hokai R, Nagata N, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Okada Y, et al. Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *J Pathol*. 2009;219(4):17-26.
- Smith W, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:145-82.
- Anai Y, Aihino S, Matsuura T, Kato T, Matsuoka M, Sanzita M, et al. Prostaglandin E-major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(7):1208-16.
- Rajkumar R, Hillard M, Lawrence T, Trivedi S, Colville-Nash P, Billington G, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12-14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(52):20979-84.
- Giriy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *Faseb J*. 2003;17(15):2269-71.
- Hokai R, Kurihara C, Nagata N, Aitale K, Okada Y, Watanabe C, et al. Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(3):G401-408.
- Izuka M, Kinno S. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2011;17(17):2161-71.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Mehe MM, Dekinderen P, des Varannes SB, Röll-Dekinderen M. The digestive neuronal-gliothelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(2):90-100.
- Coquerioge S, Duchalais E, Cheslier J, Cossas F, Röll-Dekinderen M, Neunlist M. Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):202.
- Ruhl A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil*. 2005;17(4):777-90.

17. Bush TG, Sawidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*. 1998;93(2):189–201.
18. von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:3.
19. Vesha V, Barbara G, Talamonti L, Sanghelli V, Coninckes R, Tonini M, et al. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci*. 2006;126–127:264–72.
20. Villanacci V, Bassotti G, Nasdimbeni R, Antonelli E, Cadel M, Fisogni S, et al. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20(9):1009–16.
21. Sawidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neurilist M, Bourrelle A, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of 5-hydroxytryptamine. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1344–58.
22. Neurilist M, Van Landeghem L, Bourrelle A, Sawidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2008;263(6):577–83.
23. Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourrelle A, et al. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy- Δ^2 -14-prostaglandin J₂. *J Physiol*. 2010;588(Pt 14):2533–44.
24. Neurilist M, Aubert P, Bonniaud S, Van Landeghem L, Goron E, Wedel T, et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β -dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(1):G231–241.
25. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thirard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, et al. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol*. 2008;586(7):1963–75.
26. Drummond GB. Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *J Physiol*. 2009;587(Pt 4):713–9.
27. Inokura O, Aizaki K, Nagata N, Maruyama T, Shimamoto S, Urade Y. Biochemical, functional, and pharmacological characterization of AT-56, an orally active and selective inhibitor of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem*. 2009;284(12):7623–30.
28. Van Landeghem L, Chevalier J, Mahe MM, Wedel T, Urval P, Derkinderen P, et al. Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(6):G976–987.
29. Blanchot-Josic F, Jarry A, Masson D, Bach-Ngohou K, Paineau J, Denis MG, et al. Upregulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol*. 2005;207(2):156–63.
30. Smith WJ, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathway of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev*. 2011;111(10):5821–65.
31. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*. 2000;119(3):706–14.
32. Hawkey CJ, Karmali F, Rachmilewitz D. Imbalance of prostacyclin and thromboxane synthesis in Crohn's disease. *Gut*. 1983;24(10):881–5.
33. Reuter BK, Asaha S, Buer A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2076–85.
34. McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Fathling MI, Warner TD. Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(8):1115–7.
35. Fujimori K, Fujitani Y, Kadoyama K, Kusunogoh H, Ishikawa K, Urade Y. Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1 through E-box and interleukin-1 beta via two NF-kappa B elements in rat epidermal cells. *J Biol Chem*. 2003;278(26):6018–26.
36. Park JM, Kanaoka Y, Eguchi N, Aritake K, Gruzic S, Mazer AM, et al. Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in ApcMin/+ mice. *Cancer Res*. 2007;67(3):881–9.
37. Zamuner SR, Bak AW, Devchand PR, Wallace JL. Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D₂. *Am J Pathol*. 2005;167(5):1293–300.
38. Sturm BM, Radnai B, Jand K, Stancic A, Pazmar GP, Hogenauer C, et al. Opposing roles of prostaglandin D₂ receptors in ulcerative colitis. *J Immunol*. 2014;193(2):827–39.
39. Boie Y, Sawyer N, Sipetz DM, Metzger KM, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem*. 1995;270(32):18910–6.
40. Ishii M, Asano K, Namikawa H, Tazaki S, Mizoguchi K, Asami T, et al. CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2012;188(11):5655–64.
41. Nagata K, Hiral H. The second PGD₂ receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(2–3):169–77.
42. Choi YH, Lee SN, Aoyagi H, Yamashiki Y, Yoo JY, Park B, et al. The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 protein kinase 1 cascade phosphorylates cAMP response element-binding protein to induce MUC5B gene expression via D-prostanoid receptor signaling. *J Biol Chem*. 2011;286(39):34199–214.
43. Wight DH, Ford-Hutchinson AW, Chadee K, Metzger KM. The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells. *Br J Pharmacol*. 2000;131(8):1537–45.
44. Hanson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(1):57–62.
45. Busine MP, Deveumaux P, Leteurtre E, Copin MC, Colombel JF, Porchet N, et al. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut*. 2001;49(4):544–51.
46. Neurilist M, Toumi F, Oreschikova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse G, et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VEGFR pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(5):G1028–1036.
47. Barajon I, Semao G, Amaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsani A, et al. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(11):1013–23.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Article II :

Le système nerveux entérique, source de prostaglandine E2 en conditions inflammatoires

Présentation de l'article II :

Tout comme la PGD2, la PGE2 est connue pour ses effets contradictoires sur la BEI (Dey et al., 2006). De nombreuses études démontrent également l'importance de la voie métabolique de la PGE2 dans les MICI (Ajuebor et al., 2000; Sharon et al., 1978; Shaw et al., 2010; Vong et al., 2010; Zamuner et al., 2003). Le SNE est connu pour réguler les processus d'homéostasie intestinale par la libération de divers médiateurs et son rôle dans la pathogenèse des MICI est largement évoqué (Neunlist et al., 2008, 2013, 2014b). Si une production de PGE2 par le SNE a d'ores et déjà été montrée sous l'action de bradykinines (Murakami et al., 2007), la capacité des contingents cellulaires du SNE à produire de la PGE2 dans des conditions inflammatoires reste à être démontrée. Enfin, nous avons évalué la capacité de la PGD2 à moduler la production de PGE2.

Nos objectifs étaient :

1/ d'une part d'étudier la capacité du SNE à produire de la PGE2 en condition inflammatoire et d'évaluer l'impact de la PGD2 sur cette production,

2/ d'autre part d'étudier la voie métabolique de la PGE2 et sa modulation dans la MC.

Dans un premier temps, à partir de cultures primaires de SNE, nous avons confirmé la capacité du SNE à produire de la PGE2 en condition inflammatoire. En effet, par analyse immunohistochimique, nous avons montré que la mPGES1, enzyme clé de la synthèse de la PGE2 en condition inflammatoire, est exprimée à la fois par les neurones entériques et les CGE (Figure 4). Puis, au niveau transcriptionnel, nous avons montré qu'un stress inflammatoire induit par le LPS, conduisait à une augmentation significative de l'expression de la voie de synthèse inductible de la PGE2, à savoir COX2-mPGES1 (Figure 3) et à l'absence de variation pour la voie métabolique constitutive COX1-cPGES (Figure 2). D'autre part, l'ajout de PGD2 ne modifie pas l'expression de la mPGES1 induite par le LPS (Figure 5). Ce résultat invalide l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif de l'expression de la mPGES1 par la PGD2 en condition inflammatoire. Enfin, la production de PGE2, suite à l'activation de la voie COX2-mPGES1, a été objectivée par des dosages de la PGE2 par technique immuno-enzymatique (Figure 1).

Résultats

Dans un deuxième temps, à partir d'une biocollection de muqueuses coliques de patients atteints d'une MC, quiescente ou en phase active, et de patients témoins, nous avons montré une activation de la voie de synthèse de la PGE2. En effet, au niveau transcriptionnel, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de la mPGES1 au niveau des zones ulcérées par rapport aux zones saines dans le groupe MC active. De plus, nous avons montré une augmentation significative de l'expression du récepteur EP1 dans la zone ulcérée de patient en MC active et chez les MC en phase de rémission en comparaison au groupe témoin. L'expression du récepteur EP4 est également significativement plus élevée chez les patients atteints de MC en phase active par rapport à ceux au repos ou en rémission. Ainsi, l'induction en condition inflammatoire de la mPGES1 est associée à une augmentation de l'expression des récepteurs EP1 et EP4, décrits pour leur implication dans la rupture d'intégrité de la BEI (Figure 6).

De façon similaire à la PGD2, cette étude démontre que la voie métabolique de la PGE2 est impliquée dans la physiopathologie de la MC. Elle soutient également l'hypothèse selon laquelle la PGE2 peut avoir une origine neuro-gliale dans la maladie de Crohn.

Cet article a été soumis pour publication *Molecular Medicine Reports*.

Title of the manuscript

The Enteric nervous system is an important source of PGE2 in inflammatory conditions

Authors

ANNE-GAELLE LE LOUPP^{1,2}, ANNE-SOPHIE DUQUOC¹, ARNAUD BOURREILLE^{1,3},
MICHEL NEUNLIST¹, DAMIEN MASSON*^{1,2} and KALYANE BACH-NGOHO*^{1,2}

Affiliation

¹Université de Nantes, INSERM, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, The enteric nervous system in gut and brain disorders, Nantes, France

²Department of Biochemistry, CHU Nantes, F-44093, France

³Department of Gastro-Enterology, CHU Nantes, F-44093, France

*Equal contribution

Correspondence to : Dr Kalyane Bach, Laboratoire de Biochimie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44093, France.

E-mail address: kalyane.bach@chu-nantes.fr

Key words : Prostaglandin E2, mPGES1, enteric nervous system, neurons, glial cells, inflammatory bowel disease, Crohn's disease

Abbreviations : CD, Crohn's Disease; COX, Cyclooxygenases; ECGs, Enteric Glial Cells; ENS, Enteric Nervous System; IL1B, Interleukin 1 beta; LPS, Lipopolysaccharide; MRPS6, Mitochondrial ribosomal protein S6; PG, Prostaglandins; PGD2, Prostaglandin D2; PGE2, Prostaglandin E2; PPARG, Peroxysome Proliferator-Activated Receptor Gamma; PGES, Prostaglandin E synthase ; mPGES1, microsomal isoform 1 prostaglandin E synthase; mPGES2, microsomal isoform 2 prostaglandin E synthase; cPGES, cytosolic prostaglandin E synthase; IEB, Intestinal Epithelial Barrier; qRT-PCR, Quantitative Reverse Polymerase Chain Reaction; TNF-alpha, Tumor Necrosis Factor-alpha; PBS, phosphate buffer saline; IBD, Intestinal Bowel Disease.

Running title: ANNE-GAELLE LE LOUPP *et al*: PROSTAGLANDIN E2 PRODUCTION BY THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM

Abstract

Many studies provide evidence of the importance of the prostaglandin E2 (PGE2) metabolic pathway in inflammatory bowel diseases. As the enteric nervous system (ENS) is known to regulate gut homeostasis processes *via* the release of various mediators, we investigated its ability to produce PGE2 in inflammatory conditions.

To that purpose, we studied the expression of microsomal isoform 1 prostaglandin E synthase (mPGES1), the key actor involved in the PGE2 metabolic pathway, in neurons and glial cells of rat, and measured PGE2 levels in ENS primary cultures medium after treatment by lipopolysaccharide (LPS). We also studied mRNA expression of mPGES1 and PGE2 receptors in colonic mucosal biopsies in three groups, controls, quiescent and active, of Crohn's disease (CD) patients.

We showed by immunostaining that mPGES1 is expressed in neurons and glial cells of primary culture of ENS. PGE2 levels were significantly increased in primary culture of ENS supernatant treated with LPS. In patients with active CD, inflamed colonic biopsies showed significantly higher mPGES1 mRNA expression.

This study supports the hypothesis that enteric neurons and glial cells form a functional unit reacting to inflammation by producing PGE2. Our study demonstrates that mPGES1, expressed in intestinal neurons and glial cells, is up-regulated in inflammatory conditions and that PGE2 may have a neuro-glial origin in Crohn's disease.

Introduction

Prostaglandin E2 (PGE2) is an endogenous lipid molecule that regulates important physiological functions. In the intestinal mucosa, PGE2 has a duality of action as it is involved in maintaining or breaking homeostasis of the epithelial barrier (1). In physiological conditions, the role of PGE2 is to maintain the homeostasis of intestinal epithelial barrier, especially by increasing mucin or bicarbonate secretion (2-4). But PGE2 is more known for its pro-inflammatory role *via* the induction of cytokines secretion such as the interleukin-8 (IL-8) and interleukin-12 (IL-12) or the induction of the expression of co-stimulatory molecules on dendritic cells, increasing T-cell activation (1,5-7). Furthermore, PGE2 induces an increase of epithelial barrier permeability through the activation of two PGE2 receptors, EP1 and EP4 (8).

PGE2 is synthesized intracellularly under the action of prostaglandin E synthase (PGES) on prostaglandin H2 (PGH2), which is derived from arachidonic acid by action of cyclooxygenases (COX). Both enzymes exist in various isoforms, two for COX (COX1 and COX2), and three for PGES (cPGES, mPGES1 and mPGES2). COX1 is expressed constitutively in most cell types, whereas COX2 is induced by inflammatory stimuli such as bacterial endotoxin and proinflammatory cytokines. Concerning PGES, mPGES1 and mPGES2 are membranes or microsomal isoforms while cPGES is the cytosolic one. cPGES and mPGES2 are expressed constitutively, whereas mPGES1 is induced by inflammation (9,10).

Although immune cells are main producers of cytokines and prostaglandins, cells of the mucosal microenvironment, especially those of the enteric nervous system (ENS), are also known to contribute to this production (11). Indeed, the ENS, composed of enteric neurons and enteric glial cells (EGCs), is known to regulate gut homeostasis process and in particular, intestinal epithelial barrier functions, *via* the release of various mediators (12-17). Recent studies have shown that the ENS is able to secrete various cytokines or prostaglandins, e.g. the prostaglandin D2 (PGD2) and its metabolite, the 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15dPGJ2) in basal condition, or under inflammatory stressors (13,18). Although previous studies have shown that PGE2 can be produced by ENS under bradykinin activation (19), nothing is known in inflammatory conditions. ENS cells population involved in this production also remain to be identified. Moreover, our team and others have shown the role of the ENS in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (16,18). We wondered if ENS was able to produce two prostaglandins with potentially antagonist effect, the pro-inflammatory PGE2 and the anti-inflammatory PGD2, and if PGD2 could be able to control PGE2 production in inflammatory conditions.

Based on these findings, our aims were first to investigate the ability of the ENS to express mPGES1 and to produce PGE2 in inflammatory conditions, and second, to study the expression of key actors of PGE2 metabolic pathway, mPGES and its receptors, in colonic mucosal biopsies of patients with Crohn Disease (CD).

Materials and Methods

Cell culture and treatments: Primary culture of the ENS. Primary culture of rat's ENS was performed as previously described (20). Pregnant Sprague-Dawley rats at stage E15 were purchased (CERJ, Le Genest St Isle, France) and manipulated in compliance with French institutional guidelines. These procedures were approved by the local institutional animal research committee (Certificate E. 44011; Inserm, Nantes, France). Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used. Rats were killed by CO₂ intoxication followed by severing of the carotid arteries. Embryonic guts were collected and dissected in Hank's buffered salt solution HBSS middle (Sigma, France) in the presence of streptomycin (50 µg/ml, Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and of penicillin (5U/ml, Gibco) then conserved on ice. The tissue fragments were collected in DMEM/F12 medium (1:1, Gibco) with streptomycin and penicillin for digested for 15 min at 37°C by 0.1% of trypsin (Invitrogen, France). Cells were counted and seeded in DMEM/F12 culture medium with streptomycin, penicillin and 10% of decompemented fetal bovine serum (FBS, Biowest, USA) at a density of 2.4×10^5 cells cm² on 24-well plates (Corning, Avon, France) previously coated with a 0.5% gelatin solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France). After 24h of culture, the medium was replaced by DMEM/F12 medium supplemented with 1% N2 medium (Invitrogen, France). These cells were not stained in order to stay a primary culture, but half of the media were replaced event 3 days. Established nerve connections appeared during the culture forming a node network on muscular cell layers. The ganglions, comprising 20-30% neurons and 60-75% glial cells, were interconnected by mature nerve fibers after 10 days. This system allows an pseudophysiological conditions approach. Primary cultures were treated for 1, 2, 4, 8, 24 or 48h with 0.1 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich, Lyon, France) with or without 5mM of PGD2. For RT-PCR analysis, cells were lysed in RA1 buffer and resulting lysate was collected and stored at -80°C. For immunofluorescence staining, primary cultures of rats' ENS were fixed in 4% paraformaldehyde followed by several washes in phosphate buffer saline (PBS).

RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from primary cultures or human mucosal biopsies using the Nucleospin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). cDNA was synthesized

using standard procedures as previously described (12). Real-time PCR was performed according to previous reports with some modifications (18). Primers were designed from the sequence of human cDNAs using the Universal Probe Library assay design center (https://roche_applied-science.com/sis/rtpcr/url); sequences are reported in table I. Amplification conditions of mPGES1, mPGES2n, cPGES, COX1, COX2, EP1, EP4, MRPS6, and of inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF) and interleukin-1 beta (IL1B) templates were optimized for the Rotorgene 3000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR amplifications were performed in duplicate using Light cycler 480 SYBR Green I master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. External standard curves were generated with serial 5-fold dilution of cDNA samples prepared with RNA extract from primary culture or human mucosal biopsies. The relative amounts of transcripts were calculated from these standard curves using RotorGene software. Expression of S6 ribosomal proteins (MRPS6) as internal controls was analyzed at the same time. For each sample, the ratio between the relative amount of each specific transcript and S6 was calculated to compensate variations in the quantity and quality of starting mRNA.

Immunofluorescence staining. All antibodies were diluted in PBS with 1mg/ml sodium azide, 4% horse serum and 1% Triton X-100. Primary cultures of rat's ENS were incubated with PBS sodium azide horse serum and 1% Triton X-100 followed by incubation with rabbit polyclonal anti-mPGES1 (1:500, Cayman Chemical, MI, USA) for an hour and a half at room temperature with stirring. After extensive rinsing in PBS, primary cultures were incubated with monkey anti-rabbit IgG conjugated with Cyanine 3 (1:500, Jackson ImmunoResearch, BA, USA) for 30min at room temperature with stirring. After mPGES1 staining, primary culture were incubated with mouse polyclonal anti-S100 β (1:500, Abcam, Cambridge, UK) or with mouse anti-Hu (1:200, Invitrogen, Leiden, NL) for an hour and a half at room temperature with stirring followed by donkey anti-mouse IgG conjugated with FP 488 fluorescent (1:200, Interchim, Montluçon, France). Following washes, stained samples were observed and acquired with an IX 50 microscope (Olympus, Rungis, France).

PGE2 assay. PGE2 released from cell culture in culture medium were determined using the Prostaglandin E2 ELA kit – Monoclonal (Cayman Chemical, MI, USA) according to manufacturer's instructions.

Patient selection. Tissue samples were collected from colonic biopsies of patients with CD. Thirty patients with CD treated at the Department of Gastroenterology (Nantes University Hospital,

France) were included in this study. Colonic biopsies were obtained and stored in the bio-collection of the “Institut des Maladies de l’Appareil Digestif (IMAD)”. The clinical and demographic data were collected and recorded in a computerized database securely coupled to the biological collection. This bio-collection was approved and registered by the French Ministry of Science and Research “DC-2008-402”. CD was diagnosed on the basis of clinical and endoscopic criteria. Fifteen quiescent disease patients and fifteen active disease patients, with acute or chronic inflammation, were included in this study. Two biopsies were collected from patients with active disease, one in an inflamed zone and one in a normal zone. Colonic biopsy specimens from normal mucosa were collected from fifteen patients with colonic polyps and were used as controls. All tissues were processed according to the French Guidelines for Research on Human Tissues (Agence Nationale d’Accréditation 2001). The characteristics of patients included are given in Table II. After collection, biopsies were immediately immersed in RA1 buffer (Macherey Nagel, Hoerd, France) and stored at -80°C before real-time PCR analysis. The inflammatory status of the colonic biopsies was previously determined (18).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Experimental data were compared using a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s *post hoc* test, Spearman test or Wilcoxon paired test. p value < 0.05 was considered to be significant.

Results

Inflammatory conditions enhanced PGE2 secretion by the enteric nervous system. In order to evaluate the capacity of the ENS to produce PGE2 in inflammatory conditions, primary cultures of ENS were treated for 48h with lipopolysaccharide (LPS 0.1 µg/mL). Primary culture of ENS produced PGE2 in basal condition (18 +/- 8 µg/mL). LPS enhanced significantly ENS secretion of PGE2. The increase in PGE2 secretion in ENS supernatant was 2-fold higher than control condition after 8 hours of treatment, 5-fold higher after 24h and 17-fold higher after 48 hours (Fig. 1).

ENS mRNA expression of COX1, mPGES2 and cPGES were unchanged in inflammatory conditions whereas those of COX2 and mPGES1 were increased. We further evaluated the mRNA expression of the three enzymes constitutively involved in PGE2 production, COX1, mPGES2 and cPGES, 24 hours after induction of the inflammatory stress by LPS. None of the three genes exhibited any increase in this situation (Fig. 2). We next aimed to determine if PGE2 production by ENS was associated with an activation of the PGE2 metabolic pathway by evaluating mRNA expression of COX2 and mPGES1. We showed an early and transient up-regulation of COX2, reaching its maximum 4 hours after induction of the inflammatory stress by LPS. Activation of mPGES1 occurred later, reaching its maximum 24 hours after induction (Fig. 3).

Both neurons and glial cells of the enteric nervous system expressed mPGES1. To determine whether neurons and glial cells of the enteric nervous system can express mPGES1, we performed mPGES1 immunofluorescence labeling in ENS primary culture. Both neurons and glial cells, which were selectively stained using antibodies directed against the neuronal protein Hu C/D and the glial S100b respectively, expressed mPGES1 (Fig. 4).

PGD2 did not regulate mPGES1 expression in inflammatory conditions. As ENS was able to produce two prostaglandins with potentially antagonist effect, the pro-inflammatory PGE2 and the anti-inflammatory PGD2 (as demonstrated in previous study), we wondered if PGD2 could be able to control mPGES1 expression in proinflammatory conditions. Primary cultures were then treated for 2, 4, 8, 24 or 48h with 0.1 µg/ml LPS with/without 5mM of PGD2. mPGES1 mRNA was up-regulated after induction of the inflammatory stress by LPS. However, no significant difference was observed between culture conditions with and without PGD2 (Fig. 5). Pre-treatment with PGD2 had no effect on mPGES1 expression under inflammatory conditions.

mPGES1 mRNA expression was increased in inflamed colonic mucosa of patients with active Crohn Disease). Finally, we aimed to determine if the mRNA expression of mPGES1 and of the PGE2 receptors involved in the disruption of the epithelial barrier in inflammatory bowel disease, EP1 and EP4 were modified in the colonic biopsies of control, quiescent Crohn Disease (CD) and active CD patients (healthy and hurt zone). The inflammatory status of the colonic biopsies was determined by measuring mRNA expression of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and interleukin-1 beta (IL1 β). mPGES1 was significantly up-regulated in the hurt zone of the mucosa of patients with active CD (Fig. 6A) as compared to healthy zone of the same patients, to quiescent and control subjects, and was positively and significantly correlated with IL1 β ($r=0.74$, $p<0.0001$) and COX2 ($r=0.65$, $p<0.0001$). EP1 mRNA expression was significantly increased in the hurt zone of the mucosa of active or quiescent CD patients as compared to control subjects (Fig. 6B). EP4 mRNA expression was significantly higher in patients with active CD as compared to patients with quiescent CD or control subjects (Fig. 6C) and was significantly correlated with TNF α expression ($r=0.76$, $p<0.0001$).

Discussion

Our work shows for the first time that both cellular components of the ENS, EGC and neurons, can contribute to PGE2 production, at basal level and in response to inflammatory conditions.

The ENS coordinates major gastrointestinal physiological functions and is able to regulate key functions involved in the maintenance of IEB homeostasis such as paracellular and transcellular permeability, intestinal epithelial cell proliferation and wound healing (11). This regulation is mediated by soluble factors secreted by the two cellular contingents, neurons and EGC. Although, acetylcholine, substance P and VIP are the typical neuromediators involved in the control of paracellular and transcellular permeability, our team also reported that ENS is a source of PGD2 and 15dPGJ2 (13,18), playing an anti-inflammatory or immunomodulatory role and regulating cell proliferation and differentiation through Peroxysome proliferator-activated receptor (PPAR γ), strongly expressed by the epithelial cells. Finally, recent studies suggest that the ENS can integrate a variety of microbial signals through Toll-like receptors and respond by secreting various cytokines i.e. TNF α or IL6, initiating a defensive response against pathogens and expanding inflammation (21,22). Nevertheless, the direct participation of the ENS in the inflammatory response of the gut during infectious or inflammatory episodes is not completely decrypted. However, ablation of EGC has been shown to induce a fulminant jejuno-ileite, which suggests that these cells are essential for the maintenance of IEB integrity.

We show here for the first time that both EGCs and neurons express all the enzymes necessary for PGE2 synthesis and that this secretion is highly enhanced in inflammatory conditions. Although a previous study of Murakami has shown that ENS could produce PGE2 under bradykinin activation (19), it did not identify cells responsible for this synthesis. In mucosa, undifferentiated epithelial cells, dendritic cells, myofibroblasts and macrophages are able to produce PGE2 physiologically or in inflammatory condition (23-25). Numerous stimuli e.g. substance P, LPS, or infectious conditions induce PGE2 secretion (26,27). PGE2 may then exert paracrine effects on adjacent epithelial cells which express EP receptors (28,29). Furthermore, induction of PGE2 pathway is important for the development and maintenance of an inflammatory microenvironment.

As previously stated, PGE2 is critical for colonic mucosal homeostasis. In physiological conditions, some processes are involved in the control, protection and integrity of the intestinal epithelial barrier (IEB). The IEB forms a physical barrier consisting of the lining of IEC which establishes strong and elaborate contacts with the underlying extracellular matrix. Among protection processes

of the barrier, the secretion of mucus is the first line of defense against pathogens within the gut lumen and constitutes an integral part of innate host defenses. Among prostaglandins produced by the different cellular contingents of the intestinal mucosa, PGE₂, coupling to the EP₄ receptor, enhances mucin secretion, and is key player in mucoprotection (3,4). Conversely, the expression of mucin proteins was suppressed by non-selective NSAID and this expression was restored by PGE₂ both *in vivo* and *in vitro* (30). Other protection processes are attributed to PGE₂, such as the expression of Decay-accelerating factor (DAF) that may protect the intestinal epithelium from complement attack (31).

We have previously demonstrated that ENS is an actor of IEB integrity by controlling proliferation and epithelial differentiation (12,13). ENS PGE₂ secretion at basal level may participate to this function. Indeed, it has been shown that PGE₂ promotes cell proliferation through transactivation of EGFR and mediates protection from apoptosis (32). Furthermore, PGE₂ prevents intestinal cell anoikis (33). However, epithelial cell differentiation induces a decrease in COX2 expression and PGE₂ synthesis parallel in reduction in paracellular permeability (34).

In a completely opposite way to the beneficial effects of PGE₂ in maintaining the homeostasis of the epithelial barrier, PGE₂ plays a key role in the generation of the inflammatory microenvironment and contributes to disruption of the IEB (8). A recent study demonstrated that PGE₂ increases monolayer permeability and induces disruption of the intestinal epithelial barrier. These results indicate that EP₁ and EP₄ might be directly involved in paracellular permeability (35). However, disruption of the epithelial barrier observed in inflammatory bowel disease has been traditionally attributed to cytokines (8). PGE₂ also up-regulates IL8 expression by colonic epithelial cells, which may contribute to exacerbation of inflammation in the gastrointestinal tract (36,37). Upon injury, the intestinal epithelium undergoes a wound healing process in several steps. During the early phases of repair, IEC adjacent to the injured surface, spread and migrate to cover the denuded area (epithelial restitution). Later in the repair process, proliferation of intestinal epithelial cells occurs to compensate for loss, followed by maturation and differentiation of these cells. It has been previously demonstrated that EGCs enhance epithelial restitution and cell spreading *in vitro* (14). Furthermore, as recent studies have revealed that PGE₂ modulates intestinal epithelial wound repair (38), our data suggest that ENS can also be involved in the wound healing process through this mediator.

Previous studies have showed that during inflammation, activation of TLR receptors by LPS induces the activation of the NF- κ B pathway and overexpression of COX2. Even if mPGES1

expression is induced by pro-inflammatory stimuli leading to PGE2 overproduction, LPGDS expression is also induced and generates overproduction of PGD2 even within the ENS. Moreover, in a previous study, we also showed that 15dPGJ2, metabolite of PGD2, can inhibit the NF- κ B pathway. We thus wondered if PGD2 could be able to control mPGES1 expression in inflammatory conditions. In our *in vitro* cell model, we were unable to demonstrate that PGD2 controls the production of PGE2. The soluble mediators and signalling pathways involved in the control of the production of PGE2 by the SNE remain to be determined.

Recent data are consistent with the ENS's involvement in IBD pathogenesis (39-41). These studies describe structural and functional abnormalities of the ENS (42-48). In colitis, epithelial function is impaired, leading to elevated bacterial translocation. In the submucosal plexus, neurons and glial cells expressing Toll-like receptors may participate in an adaptative reaction. This cellular reaction is similar to the proinflammatory process named reactive gliosis. The role of Prostaglandins in the pathogenesis of IBD was first suggested in 1977 (49). Then, numerous studies have demonstrated the involvement of PGE2 as a soluble proinflammatory mediator in IBD (50-51). The results of our study are consistent with available literature. We observed an up-regulation of mPGES1 in the hurt zone of the mucosa of patients with active CD. The colonic expression of EP4 in colonic biopsy specimens was significantly increased in patients with active CD compared to patients with quiescent CD or healthy subjects and EP1 expression was significantly increased in the hurt zone of the mucosa of patients with active CD or patients with quiescent CD compared to healthy subjects. These results confirm the increased sensitivity of the intestinal mucosa to PGE2 in an inflammatory situation. Our study shows that PGE2 has a neuro-glial origin in inflammatory conditions and especially in Crohn's disease.

Conclusion

The ENS is a major constituent of the intestinal mucosal microenvironment known to regulate gut homeostasis process and in particular, intestinal epithelial barrier functions *via* the release of various mediators. We show that the metabolic pathway of PGE2 is activated in IBD. Our study demonstrates that mPGES1, expressed in intestinal neurons and glial cells, is up-regulated in inflammatory conditions and suggests that PGE2 can have a neuro-glial origin in Crohn's disease.

Acknowledgments

This work was supported by grants from INSERM (Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale), Nantes University, and the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Nantes. The authors are grateful to Alison Mc Lean for English revision of the manuscript.

References

- 1) Dey I and Lehjeune M and Chadee K: Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 149: 611-23, 2006.
- 2) Akiba Y and Kaunitz JD: Prostaglandin pathways in duodenal chemosensing. *J Gastroenterol Hepatol* 29 Suppl 4: 93-98, 2014.
- 3) Willemsen LE, Koetsier MA, van Deventer SJ and van Tol EA: Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 52: 1442-1447, 2003.
- 4) Belley A and Chadee K: Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor. *Gastroenterology* 117: 1352-1362, 1999.
- 5) Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y and Narumiya S: Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 15: 633-640, 2009.
- 6) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H and Narumiya S: Prostaglandin E₂ promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nat Commun* 4: 1685, 2013.
- 7) Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E and Groettrup M: Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol* 176: 966-973, 2006.
- 8) Rodriguez-Lagunas MJ, Martin-Venegas R, Moreno JJ and Ferrer R: PGE2 promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C324-C334, 2010.
- 9) Park JY, Pillinger MH and Abramson SB: Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* 119: 229-240, 2006.
- 10) Kudo I and Murakami M: Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 38: 633-638, 2005.
- 11) Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB and Rolli-Derkinderen M: The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 90-100, 2013.
- 12) Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F and Galniche JP: Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G231-G241, 2007.

- 13) Bach-Ngohou K, Mahé MM, Aubert P, Abdo H, Boni S, Bourreille A, Denis MG, Lardeux B, Neunlist M and Masson D: Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 588: 2533-2544, 2010.
- 14) Van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Savidge T and Neunlist M: Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G976-G987, 2011.
- 15) Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, Galmiche JP, Vanden Berghe P, Neunlist M and Lardeux B: Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J* 24: 1082-1094, 2010.
- 16) Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R and Sofroniew MV: Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132: 1344-1358, 2007.
- 17) Toumi F, Neunlist M, Denis MG, Oreshkova T, Laboisie CL, Galmiche JP and Jarry A: Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 187-191, 2004.
- 18) Le Loupp AG, Bach-Ngohou K, Bourreille A, Boudin H, Rolli-Derkinderen M, Denis MG, Neunlist M and Masson D: Activation of the prostaglandin D2 metabolic pathway in Crohn's disease: involvement of the enteric nervous system. *BMC Gastroenterol* 15: 112-123, 2015.
- 19) Murakami M, Ohta T, Otsuguro KI and Ito S: Involvement of prostaglandin E2 derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 145: 642-653, 2007.
- 20) Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P and Neunlist M: Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 586: 1963-1975, 2008.
- 21) Coquenlorge S, Duchalais E, Chevalier J, Cossais F, Rolli-Derkinderen M and Neunlist M: Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J Neuroinflammation* 11: 202, 2014.
- 22) Burgueño JF, Barba A, Eyre E, Romero C, Neunlist M and Fernández E: TLR2 and TLR9 modulate enteric nervous system inflammatory responses to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 13: 187, 2016.
- 23) Walton KL, Holt L and Sartor RB: Lipopolysaccharide activates innate immune responses in murine intestinal myofibroblasts through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G601-G611, 2009.

- 24) Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW and Sheng H: Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res* 66: 846-855, 2006.
- 25) Seymour ML, Binion DG, Compton SJ, Hollenberg MD and MacNaughton WK: Expression of proteinase-activated receptor 2 on human primary gastrointestinal myofibroblasts and stimulation of prostaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 605-616, 2005.
- 26) Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Rhee SH, Moyer MP and Pothoulakis C: Substance P stimulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 expression through JAK-STAT activation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 176: 5050-5059, 2006.
- 27) Bowman CC and Bost KL: Cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production in mesenteric lymph nodes and in cultured macrophages and dendritic cells after infection with *Salmonella*. *J Immunol* 172: 2469-2475, 2004.
- 28) Takafuji V, Cosme R, Lublin D, Lynch K and Roche JK: Prostanoid receptors in intestinal epithelium: selective expression, function, and change with inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 63: 223-235, 2000.
- 29) Olsen Hult LT, Kleiveland CR, Fosnes K, Jacobsen M and Lea T: EP receptor expression in human intestinal epithelium and localization relative to the stem cell zone of the crypts. *PLoS One* 6: e26816, 2011.
- 30) Tanaka K, Suemasu S, Ishihara T, Tasaka Y, Arai Y and Mizushima T: Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-dependent exacerbation of colitis. *Eur J Pharmacol* 603: 120-132, 2009.
- 31) Shao J, Yang VW and Sheng H: Prostaglandin E2 and Krüppel-like transcription factors synergistically induce the expression of decay-accelerating factor in intestinal epithelial cells. *Immunology* 125: 397-407, 2008.
- 32) Holla VR, Mann JR, Shi Q and DuBois RN: Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. *J Biol Chem* 281: 2676-2682, 2006.
- 33) Joseph RR, Yazer E, Hanakawa Y and Stadnyk AW: Prostaglandins and activation of AC/cAMP prevents anoikis in IEC-18. *Apoptosis* 10: 1221-1233, 2005.
- 34) Martín-Venegas R, Roig-Pérez S, Ferrer R and Moreno JJ: Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation. *J Lipid Res* 47: 1416-1423, 2006.
- 35) Safdari BK, Sia TC, Wattoo DA and Smid SD: Effects of pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharide and COX-2 mediators on human colonic neuromuscular function and epithelial permeability. *Cytokine* 83: 231-238, 2016.

- 36) Yu Y and Chadee K: Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 161: 3746-3752, 1998.
- 37) Dey I, Gienbycz MA and Chadee K: Prostaglandin E(2) couples through EP(4) prostanoid receptors to induce IL-8 production in human colonic epithelial cell lines. *Br J Pharmacol* 156: 475-485, 2009.
- 38) Miyoshi H, VanDussen KL, Malvin NP, Ryu SH, Wang Y, Sonnek NM, Lai CW and Stappenbeck TS: Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *EMBO J* 36: 5-24, 2017.
- 39) Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH and Sofroniew MV: Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93: 189-201, 1998.
- 40) Cabarrocas J, Savidge TC and Liblau RS: Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41: 81-93, 2003.
- 41) Capoccia E, Cirillo C, Gigli S, Pesce M, D'Alessandro A, Cuomo R, Samelli G, Steardo L and Esposito G: Enteric glia: A new player in inflammatory bowel diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol* 28: 443-451, 2015.
- 42) Collins SM, Van Assche G and Hogaboam C: Alterations in enteric nerve and smooth-muscle function in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 3: 38-48, 1997.
- 43) Geboes K and Collins S: Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10: 189-202, 1998.
- 44) Sanovic S, Lamb DP and Blennerhassett MG: Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155: 1051-1057, 1999.
- 45) Sharkey KA and Kroese AB: Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec* 262: 79-90, 2001.
- 46) Roberts PJ, Morgan K, Miller R, Hunter JO and Middleton SJ: Neuronal COX-2 expression in human myenteric plexus in active inflammatory bowel disease. *Gut* 48: 468-472, 2001.
- 47) Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B and Geboes K: Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 20: 1009-1016, 2008.
- 48) Pochard C, Coquenlorge S, Jaulin J, Cenac N, Vergnolle N, Meurette G, Freyssinet M, Neunlist M and Rolli-Derkinderen M: Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* 150: 168-80, 2016.
- 49) Gould SR, Brash AR and Conolly ME: Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet* 2: 98, 1977.

- 50) Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R and Prokopowicz D: Mucosal and plasma prostaglandin E2 in ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 46: 2338-2342, 1999.
- 51) Vong L, Ferraz JG, Panaccione R, Beck PL and Wallace JL: A pro-resolution mediator, prostaglandin D(2), is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12023-12027, 2010.

Figure legends

Figure 1. Enteric nervous system and PGE2 production in inflammatory conditions. Primary cultures of ENS were treated with LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data were expressed as mean \pm SEM (n = 4, ***p < 0.001, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test)

Figure 2. Quantitative RT-PCR analysis of COX1, cPGES and mPGES2 by primary cultures of ENS in inflammatory conditions. Primary cultures were treated for 24h with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS. Data were normalized to MRPS6 gene expression (n=4, Wilcoxon test)

Figure 3. Quantitative RT-PCR analysis of COX2 and mPGES1 by primary cultures of ENS in inflammatory conditions. Primary cultures were not treated (0h) or treated for 1, 2, 4, 8, 24 or 48h with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS. Data were normalized to MRPS6 gene expression (n=6, ***p < 0.001; **p < 0.01; ^{###}p < 0.01; [#]p < 0.05, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test)

Figure 4. Immunofluorescence staining of mPGES1(A, B), Hu (C) and S100B (D) in primary cultures of rat ENS. Hu and S100B were colocalized with mPGES1 (E, F). Scales bars are 50 μm .

Figure 5. Quantitative RT-PCR analysis of mPGES1 by primary culture of ENS treated with LPS +/- PGD2. Primary cultures of ENS were treated for 2, 4, 8, 24 or 48h with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS with or without 5mM of PGD2. Data were normalized to MRPS6 gene expression (n=8, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test)

Figure 6. Quantitative RT-PCR analysis of mPGES1 (A), EP1 (B) and EP4 (C) gene expression in colonic biopsies from healthy subjects (CTRL), CD patients with quiescent or active disease (normal zone and inflamed zone). Data were normalized to MRPS6 gene expression (n=15, *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test)

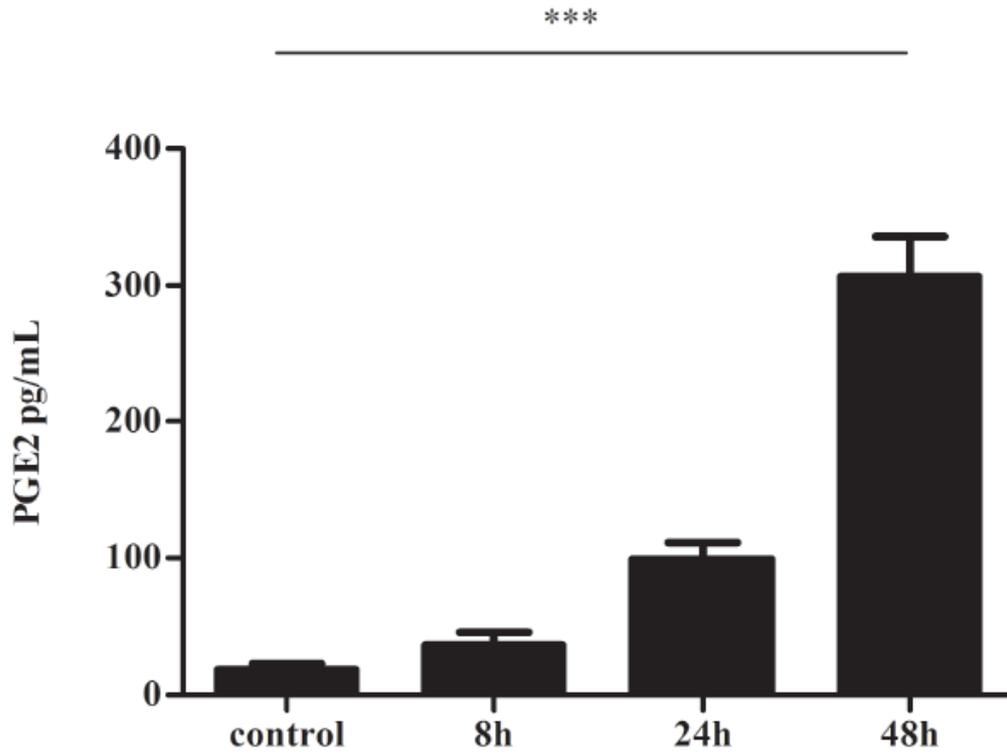


Figure 1

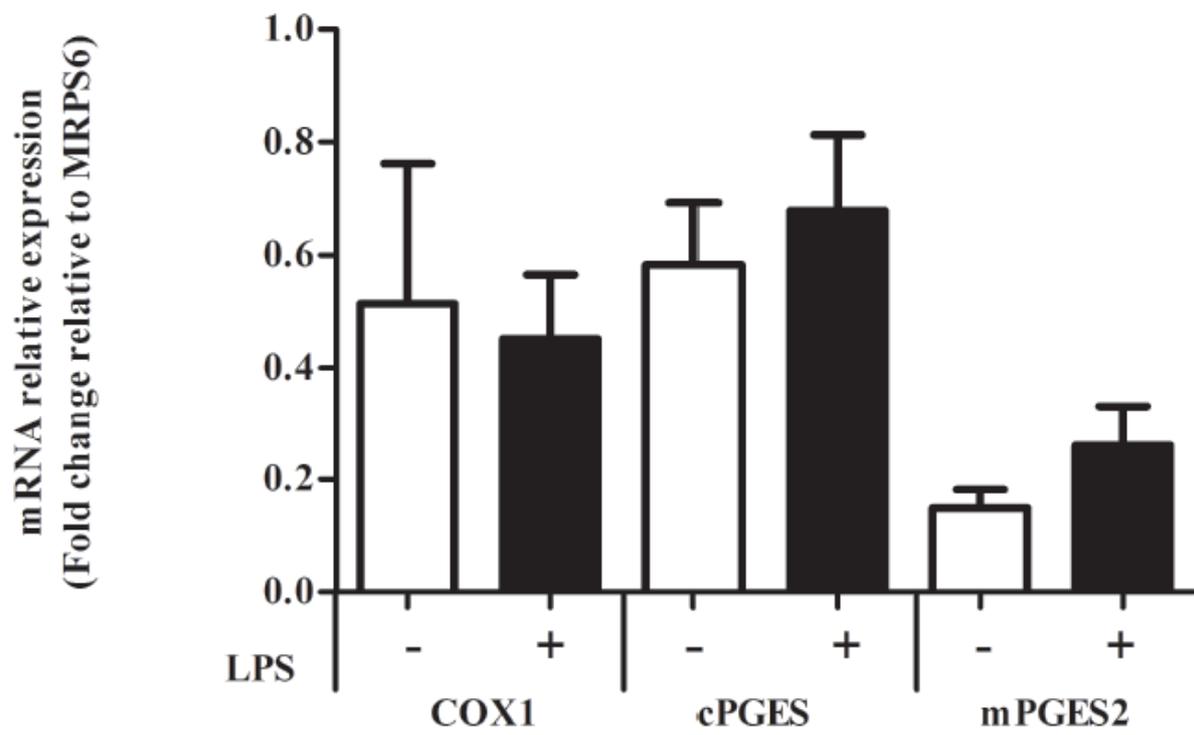


Figure 2

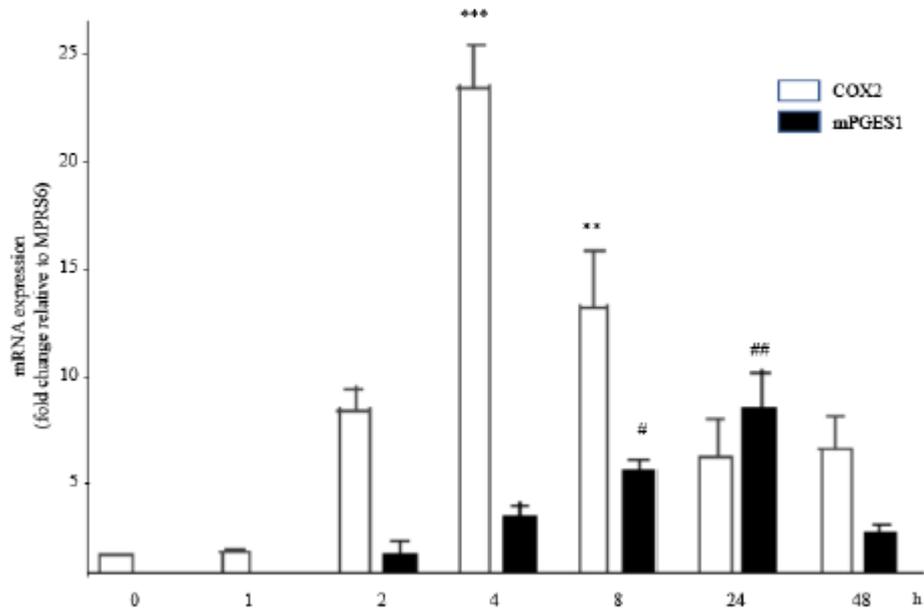


Figure 3

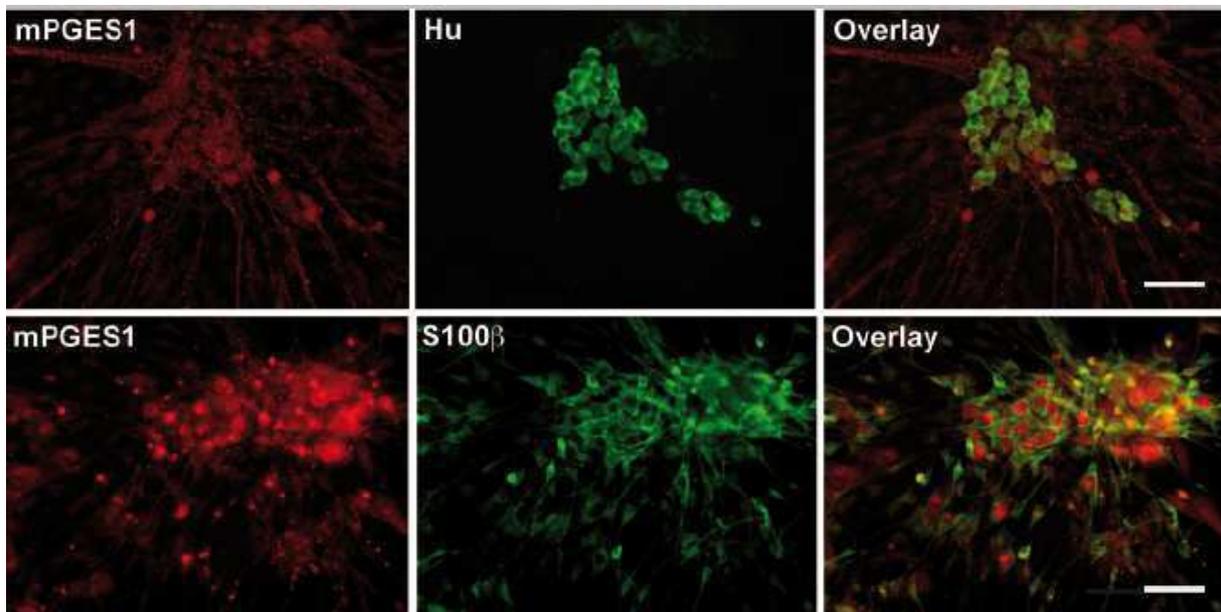


Figure 4

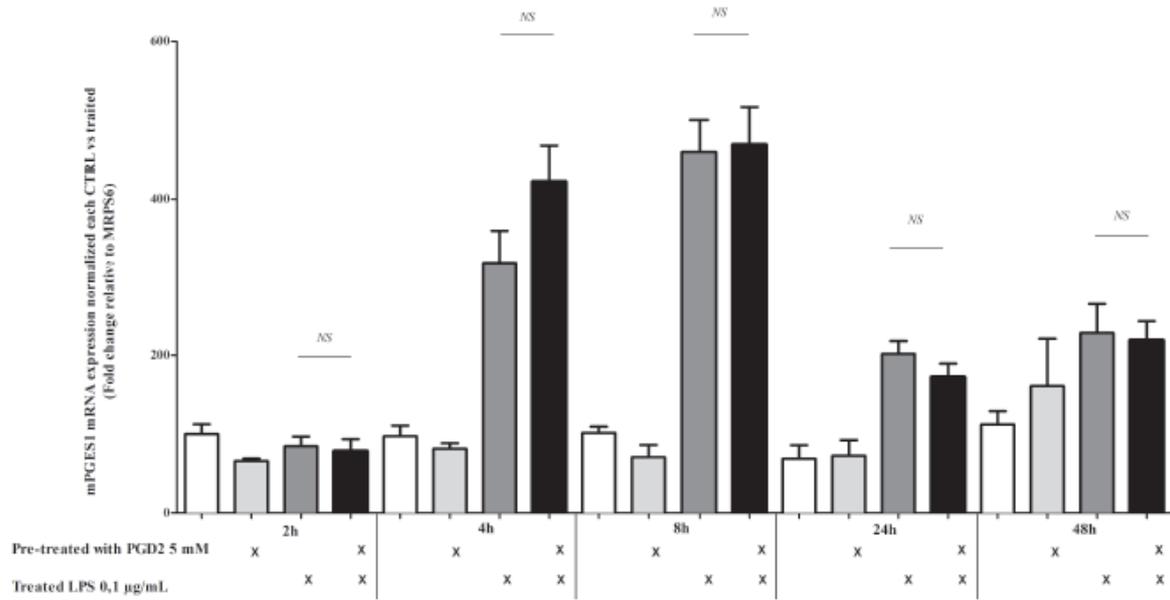


Figure 5

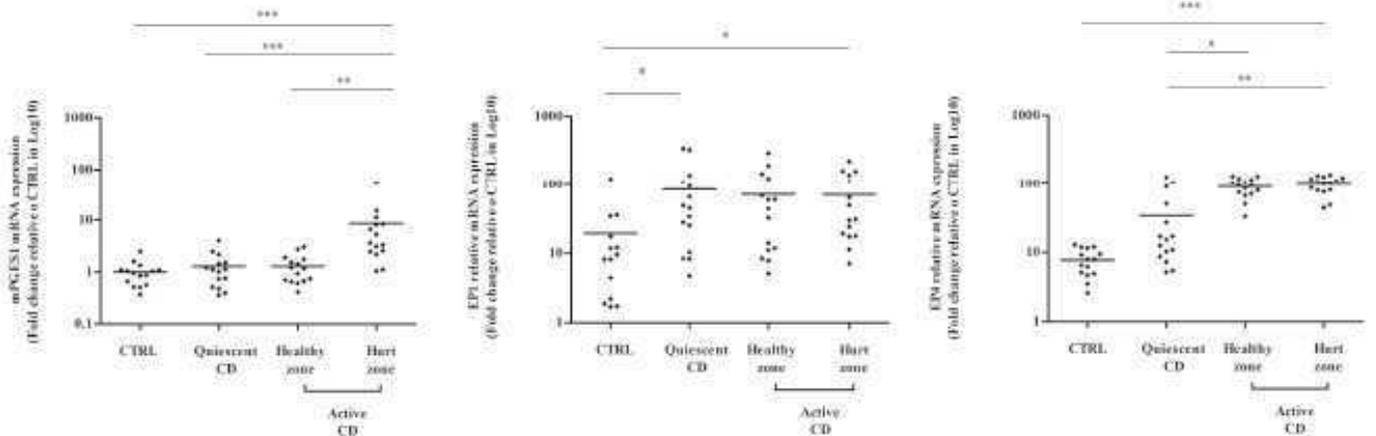


Figure 6

**Etude de l'impact de la PGD2 sur la muqueuse intestinale en
conditions physiologiques**

a) Introduction :

Nos travaux présentés dans l'article I et II démontrent la capacité du SNE à sécréter la PGD2 et la PGE2 en conditions inflammatoires et soulignent l'importance de la voie de synthèse de ces deux médiateurs dans la physiopathologie des MICI. Si l'effet de la PGE2 sur la BEI a déjà été en partie décrypté, l'impact bénéfique ou délétère de la production de PGD2 sur la BEI reste controversé (Annexe 1). Il est à noter que le peu de données disponibles dans la littérature concernant l'effet de la PGD2 notamment *via* ses récepteurs DP1 et DP2 sur la BEI est très certainement le reflet de l'absence de modèle cellulaire d'étude adapté, la majorité des lignées dérivées d'adénocarcinome colorectal en étant déficientes (Hawcroft et al., 2004).

La PGD2 pourrait agir comme un médiateur pro-inflammatoire et participer au processus de rupture d'intégrité de la barrière comme la PGE2, l'IFN γ ou le TNF α (Rodriguez-Lagunas et al., 2010; Wang et al., 2005). A l'inverse, la PGD2 pourrait agir comme un médiateur anti-inflammatoire par inhibition des cellules immunocompétentes et participer aux processus de réparation de la BEI, à savoir : prolifération, différenciation et mobilité cellulaire. L'effet bénéfique de la PGD2 en condition pathologique pourrait également être lié à son action sur d'autres contingents cellulaires que les CEI. Enfin, la dualité des effets observés pourrait reposer sur les différentes voies de signalisation activées par ses récepteurs (DP1, DP2 et PPAR γ) et une régulation de leur expression lors des MICI.

Au regard de ces données, nous avons engagé une étude transcriptomique pan-génomique à partir de cultures d'explants de muqueuse colique humaine dans le but d'identifier les voies de signalisations activées, des gènes cibles ou des fonctions régulées par la PGD2 sur la BEI. En effet, cette analyse globale permet de cribler la totalité du transcriptome afin d'identifier une expression différentielle de gènes suite à un traitement des explants par de la PGD2 pendant 24h. Des études transcriptionnelles et fonctionnelles ont ensuite été réalisées pour vérifier la validité des hypothèses émises lors de notre analyse des données d'expression sur cultures cellulaires à partir de la lignée LS174T.

b) Matériels et méthodes:

(I) *Analyse transcriptionnelle*

(a) **Analyse transcriptomique pan-génomique :**

L'analyse transcriptomique pan-génomique a été réalisée en collaboration avec la plateforme Biogenouest à partir de cultures d'explants de muqueuse colique humaine normale cultivés 24h en présence ou non de PGD2 (Anne Jarry, EA Biométhadys) (Jarry et al., 2008). Les explants utilisés étaient issus de 4 résections chirurgicales de côlon de patients. Sur chacun d'entre eux, deux conditions ont été réalisées : absence de traitement et 5 μM de PGD2 pendant 24 h. Les ARNm totaux ont été extraits, amplifiés et marqués par un fluorophore vert ou rouge (contrôle vs traité) et hybridés sur des puces à ADN (Lame Agilent : G4845 Human GE 44K V2). Du fait d'une qualité médiocre des ARN pour les échantillons d'un patient, seuls ceux de 3 patients ont été inclus dans l'analyse transcriptomique finale. Les données brutes ont par la suite été normalisées selon la méthode de LOWES et filtrées afin d'éliminer les sondes non informatives. Cette filtration a permis de conserver 17165 sondes sur 33258. La suite de l'analyse a été effectuée sur ces 17165 sondes *via* une analyse par *clustering* permettant la hiérarchisation des données selon des groupes similaires afin de classer les gènes du plus sous-exprimé au plus surexprimé. Un test de Student a été réalisé pour chaque sonde et une Pvalue lui a été attribuée. Cette classification montre que les échantillons ne se classent pas par réplicats mais par patient, ce qui n'a pas permis à l'équipe Biogenouest de discriminer les conditions « traitées avec 5 μM de PGD2 » et « non traitées ». Ils n'ont donc pas pu identifier de gènes ayant une expression significativement différente selon les conditions étudiées.

(b) **Analyse transcriptionnelle (RT-qPCR)**

✓ *Extraction et purification des ARN totaux*

La purification des ARN totaux a été réalisée avec le kit d'extraction Nucleospin RNA/Protein® (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Les ARN totaux ont été élués dans 40 μL d'eau RNase free et conservés à -80°C .

✓ *Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)*

Les échantillons ont été préalablement dosés par spectrophotométrie à 260 nm sur Nano-drop® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pointoise, France) puis dilués dans de l'eau RNase-DNase free pour obtenir une quantité de 1 µg d'ARN dans un volume de 15 µL. Les ARN ont été dénaturés dans un thermocycleur (PTC-100, Biorad, France) à 72°C pendant 3 min puis rétrotranscrits selon un programme de température prédéfini (5 min à 25°C puis 5min à 50°C et enfin 15 min à 70°C) dans un volume réactionnel total de 25 µL. La composition du milieu réactionnel au cours de la synthèse d'ADN complémentaire est détaillée dans le Tableau I. Les échantillons d'ADNc ont ensuite été dilués au 1/40^{ème}, puis stockés à -20°C.

Tableau I : Composition du milieu réactionnel au cours de la synthèse d'ADN complémentaire

Réactifs	Volume (µL)
Eau RNase/DNase free	0,5
Tampon 5X (Invitrogen)	5,0
DTT (dithiothréitol) 0,1M (Invitrogen)	1,0
dNTPs (dinucléotides triphosphates) 100mM (Invitrogen)	1,0
Random Primer 3 g/L (Invitrogen)	1,0
Reverse Transcriptase super script III 200 U/µL (Invitrogen)	0,5
RNase out (Recombinante Ribonuclease Inhibitor) 40 U/µL	1,0

✓ *PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)*

Les réactions d'amplification ont été réalisées sur l'appareil Rotorgene 2000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le milieu réactionnel de 15 µL est détaillé dans le Tableau II.

Tableau II: Composition du milieu réactionnel au cours de la RT-qPCR

Réactifs	Volume (µL)
Mix Light cycler Fast Sybr ou Roche	7,5
Amorce sens (3µM)	1,25
Amorce anti-sens (3µM)	1,25
ADNc (dilution 1/40)	5

Pour l'ensemble des RT-qPCR, une gamme étalon composée de cinq dilutions d'un échantillon contrôle (1/20 ; 1/100 ; 1/500 ; 1/2500 ; 1/125000) a été réalisée. Pour chaque point de gamme, une valeur de threshold Cycle (Ct) a été mesurée. Une droite d'étalonnage a ainsi pu être construite pour permettre le dosage des échantillons. L'ensemble des courbes de fusion obtenues a été examiné afin de s'assurer de l'existence d'un pic unique, synonyme d'amplification spécifique. Le gène codant pour la protéine ribosomale S6 ou celui codant

pour la β -actine, exprimés de façon constitutive dans toutes les cellules, ont été utilisés pour la normalisation des résultats. Les résultats ont donc été exprimés en : quantité de transcrits du gène d'intérêt / quantité du transcrit du gène S6 (ou β -actine). La programmation de la PCR suit les étapes suivantes : 10 min à 95°C – [10s à 95°C – 15s à 63°C – 20s à 72°C] x45. Les séquences des différentes amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau III.

Tableau III: Séquence des amorces des gènes étudiés

Gène	Espèce	Numéro d'accession	Fournisseur	Séquence
β -actine	Homme / rat	NM_001101.3	Sigma Aldrich	Sens : CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG
				Anti-sens : GGAGCAATGATCTTGATCCTTC
DP1	Homme	NM_000953		Sens : CCTGGAGGAGCTGGATCA
				Anti-sens : GCTCCATAGTAAGCGCGATAA
DP2	Homme	NM_004778		Sens : CCTGTGCTCCCTCTGTGC
				Anti-sens : TCTGGAGACGGCTCATCTG
PBLD	Homme	NM_001033083.1	Sens : GGCTGAAGACCCAGTGACAG	
			Anti-sens : GAGCTGTCCTACCATGCATT	
LGALS3	Homme	NM_001177388.1	Sens : CTTCTGGACAGCCAAGTGC	
			Anti-sens : AAAGGCAGGTTATAAGGCACAA	
RPS6KL 1	Homme	NM_031464.4	Sens : CAGGTACTTTGTGAGCGAGGA	
			Anti-sens : AGGTGGGACCAGAGAGTGC	
JAG1	Homme	NM_000214.2	Sens : GGCAACACCTTCAACCTCA	
			Anti-sens : GCCTCCACAAGCAACGTATAG	
SUSD2	Homme	NM_019601.3	Sens : CTGAACCAGGAGGTGCTGA	
			Anti-sens : AGCCACCGACAGGAACATT	
DACT2	Homme	NM_001286350.1	Sens : ATGTGGGCACAGCCTCAG	
			Anti-sens : CCGTCGCTCATCTCGTAAA	
JAK3	Homme	NM_000215.3	Sens : CTACGCCCTCAACTATCTGGA	
			Anti-sens : TTCCGGGCAGAGACATTG	
S6	Homme / rat	NM_001010	Sigma Aldrich	Sens : CCAAGCTTATTCAGCCGCTTGTTACTCC
				Anti-sens : CCGTGGAGTCCTTCATTCTTTCAC
COX2	Rat	NM_017232.2		Sens : GGGAGTCTGGAACATTGTGAA
				Anti-sens : GCACATGTAAGTAGGTGGACTGT
L-PGDS	Rat	NM_013015.2		Sens : TTTGGTCAATAATGCTGGAGTG
				Anti-sens : AAAGACAAAAGTGTGGTACTGC
mPGES1	Rat	NM_021583.2		Sens : GCACACTGCTGGTCATCAAG
				Anti-sens : ACGTTTCAGCGCATCCTC

(2) Lignées cellulaires

Nous avons utilisé la lignée cellulaire LS174T, dérivée d'un adénocarcinome colorectal humain, comme modèle de CEI. Les cellules LS174T ont été cultivées dans un milieu MEM (Earle's Salts, L-glutamine, Gibco, France) supplémenté avec 10% de SVF décomplé-

Résultats

menté (Biowest), 1 mM de sodium pyruvate (Gibco, France), streptomycine (50 µg/mL, Gibco, France) et de pénicilline (5 U/mL, Gibco, France). Les milieux de culture et les différents réactifs ont été maintenus en conditions stériles. Le changement de milieu (tous les 2-3 jours) et toutes les expériences ont été effectués sous hotte à flux laminaire. Lorsque les cellules arrivaient à plus de 80% de confluence, elles ont étéensemencées dans une nouvelle flasque de la façon suivante : après élimination du milieu de culture, les cellules sont rincées une fois avec du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X, Gibco, France) stérile. Puis 1 ml de trypsine-EDTA est ajouté et la flasque de 25 cm² (Corning, USA) est placée à 37°C pendant 5 à 10 min. Une fois les cellules dissociées, la trypsine est neutralisée par 4 mL de milieu contenant du SVF, et 1/10^{ème} de la suspension cellulaire est transférée dans la nouvelle flasque préalablement remplie de 8 mL de milieu. Les 4,5 mL de suspension cellulaire restant serviront aux différentes expériences. Pour cela les cellules LS174T sontensemencées sur filtre à une densité de 50 000 cellules par filtre, sur une plaque de 24 puits à fond plats (Corning, USA) puis cultivées jusqu'à 14 jours dans un incubateur à 37°C, sous 5% de CO₂. Le milieu est remplacé pour moitié tous les 2 jours.

De plus, les cDNA issus de différentes lignées de CEI (Caco-2, HT29 cl16E, HCT116, SW1116, LS174T, T84, SW620) ainsi que des culots cellulaires de CEI humaines isolées à partir de biopsies coliques saines (A. Jarry, EA Biomethadys) ont été utilisées pour une analyse transcriptionnelle de DP1 et DP2 par les CEI.

(3) Western Blot

✓ Extraction protéique et dénaturation

La purification de la totalité des protéines a été réalisée avec le kit d'extraction Nucleospin RNA/Protein (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Le culot protéique a alors été repris dans 40 µL de PSB-TCEP puis dénaturé à 95°C pendant 3 min.

✓ Migration sur gel d'acrylamide

Les échantillons ont été préalablement dosés par spectrophotométrie à 280 nm sur Nano-drop® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pointoise, France), afin de déposer 15 µg de pro-

téines par puits d'un gel NuPage Novex 4-12% Bis-Tris MiniGels (Invitrogen, France). L'électrophorèse a été réalisée en tampon Bis-Tris sous un courant de 90 Volt pendant 30 min puis 120 Volt pendant 1h.

✓ *Transfert sur membrane*

Après la migration, grâce à un système iBlot® 2 Gel Transfer (Life Technologies), les protéines ont été transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Novex) sous voltage constant de 20 Volt pendant 7 min. La qualité du transfert a été contrôlée par une coloration au rouge ponceau.

✓ *Blocage et détection*

Après transfert, la membrane a été rincée dans du tampon Tris-HCl Salin contenant du Tween® 20 (TBS-T ; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150mM (v/v), Tween® 20 0,1%). Les sites de fixations aspécifiques ont été saturés par incubation de la membrane dans du tampon TBS-T contenant 5% de lait en poudre écrémé pendant 30min sous agitation à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire (Tableau IV) dilué dans du TBS-T contenant 5% de lait pendant la nuit à 4°C, sous agitation.

Tableau IV: Listes des Anticorps utilisés dans la réalisation des Western blot

Anticorps Primaire			
Cible	Espèce	Fournisseur	Dilution
DP1	Lapin	Cayman Chemical	1/200
DP2	Lapin	Cayman Chemical	1/200
β-Actine	Souris	Sigma	1/5000
Anticorps Secondaire			
Cible	Espèce	Fournisseur	Dilution
Ac de Lapin	Chèvre	Thermo Scientific	1/1000
Ac de Souris	Chèvre	Thermo Scientific	1/10000

Le lendemain, la membrane a été rincée 3 fois pendant 5min avec du TBS-T. Elle a ensuite été incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (HRP ; Tableau I) sous agitation à température ambiante. L'activité enzymatique a été détectée par chimioluminescence après incubation 5 min avec de l'ECL (BioRad) grâce au système Che-

midoc™ de BioRad. Les bandes visualisées ont été normalisées par rapport au signal protéique de la β -actine et quantifiées par densitométrie grâce au logiciel « ImageLab™ ».

(4) Etude du rôle de la PGD2

Afin d'étudier le rôle de la PGD2 sur un modèle de CEI, nous avons ensemencé 50000 cellules LS174T par filtre dans une plaque de 24 puits (Corning, France). La plaque a été divisée en trois parties. Huit de ces puits ont servi à la culture de cellules pendant 2 jours avant traitement, 8 autres pour des cultures de 5 jours et enfin les 8 derniers ont été utilisés pour des cultures sur 7 jours (Figure I). Le traitement par 5 μ M de PGD2 a été réalisé deux fois à intervalle de 24h entre chaque dose et ce, pour 4 puits sur 8. Afin d'effectuer le traitement des cellules, la PGD2 a été diluée dans le milieu de culture et mis en contact avec les cellules, sur et sous le filtre. 48 h après le premier traitement, 3 puits traités et 3 puits non traités ont servi à la mesure de la résistance transépithéliale et à la récupération du lysat cellulaire par 600 μ L de tampon de lyse RA1 (Macherey-Nagel) permettant l'extraction des ARNm et des protéines. Le comptage cellulaire a été effectué sur les deux puits restant (un puits traité et un puits non traité).

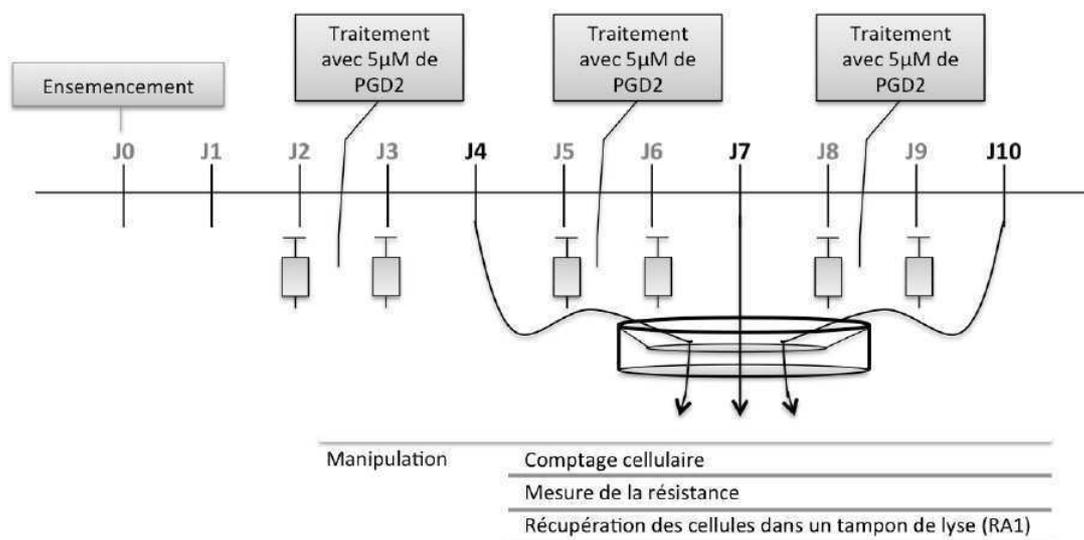


Figure I : Schéma du protocole expérimental mis en place pour étudier le rôle de la PGD2 sur une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colorectal, la LS174T

✓ *Mesure de la résistance transépithéliale :*

La résistance transépithéliale électrique (TEER) a permis d'évaluer et de suivre l'intégrité, la maturité et l'étanchéité d'une monocouche de cellules mimant la barrière intestinale. Sa mesure est simple, fiable et non destructrice. Elle consiste à apprécier le flux d'électrolytes entre les compartiments donneur et receveur à l'aide de deux électrodes. Une valeur élevée de TEER signifie qu'une monocouche est étanche et que de nombreuses jonctions serrées s'y sont formées. Par contre, une chute du TEER peut indiquer une augmentation de la perméabilité paracellulaire. La mesure de la TEER a été réalisée à l'aide d'un appareil Millicell®-ERS (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Pour chaque puits, trois mesures ont été prises autour du filtre, avec 200µL de milieu culture en apical et 1mL en basal. Ces valeurs de TEER ont été exprimées en ohm.cm².

✓ *Comptage cellulaire*

Le comptage cellulaire a été effectué sur une suspension cellulaire obtenue après décollement des cellules du filtre. Après élimination du milieu de culture, les cellules ont été rincées une fois avec du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X, Gibco, France) stérile. Puis, 50 µL de trypsine-EDTA a été ajouté du côté apical du filtre. La plaque a été placée à 37°C pendant 5 à 10 min. Une fois les cellules dissociées, la trypsine a été neutralisée par l'ajout de 250 µL de milieu contenant du SVF. La suspension cellulaire a alors été diluée au demi dans 200 µL de milieu et 50 µL de bleu trypan. Pour dénombrer les cellules, 15 µL de suspension cellulaire ont été placés sur une cellule de Malassez sous une lamelle de verre. Chaque comptage des cellules a été effectué 4 fois.

(5) *Analyses Statistiques*

Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé pour la comparaison des résultats entre deux conditions. Ce test a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism (San Diego, Californie, USA). Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

c) Résultats et discussion

(1) Sélection de gènes cibles de la PGD2 par une analyse transcriptomique pangénomique

L'analyse transcriptomique pan-génomique n'a pas permis d'identifier de gènes dont l'expression est significativement différente entre les conditions étudiées (contrôle *versus* traité). Nous avons néanmoins effectué une analyse ciblée afin de chercher des gènes cibles de la PGD2. Elle a été réalisée à partir du tableau de données brutes transmis par Biogenouest qui sont la représentation numérique de l'intensité de fluorescence pour 17165 gènes en conditions traités ou non pour chaque patient (Annexe 2). Le travail de sélection a tout d'abord été basé sur le rapport de l'intensité de fluorescence du traité par rapport au contrôle pour chaque patient, de la moyenne des trois rapports plus ou moins l'écart-type à la moyenne. Ainsi, nous avons sélectionné les 15 gènes les plus surexprimés ainsi que les 7 gènes les plus sous-exprimés. Une recherche bibliographique a été accomplie pour ces différents gènes dans le but de rechercher un éventuel lien avec la PGD2, les CEI et/ou les MICI. De cette étude bibliographique (Tableau V) découlent 7 gènes impliqués dans les processus d'homéostasie de la BEI.

Tableau V: Tableau répertoriant les 7 gènes sélectionnés suite à l'analyse transcriptomique impliquant potentiellement le rôle de la PGD2 sur la barrière épithéliale intestinale.

Processus	Nom du gène	Ratio traité / non traité				Nom de la protéine	Nombre d'isoforme	Fonctions	Référence Bibliographique
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Moyenne SEM				
Prolifération	SUSD2	1,01	1,77	1,46	1,41	Sushi domain containing protein 2	1	Protéine d'interaction : sa liaison à CSBF (une cytokine) inhibe la prolifération cellulaire dans le cancer colorectal.	PAN ET AL., 2014
	JAK3	0,51	0,51	0,88	0,63	Janus Kinase 3	3	Tyrosine kinase qui interagit avec les protéine STAT. Cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire. Dans les MICI, quand l'IL2 est en concentration importante JAK3 provoque l'apoptose des CEI.	MISHRA ET AL., 2012
	DACT2	0,49	0,39	0,66	0,51	Dapper Homolog 2	4	Protéine inhibitrice de la voie de Wnt / b-caténine : voie impliquée dans la prolifération cellulaire.	WANG ET AL., 2014
	JAG1	1,00	1,89	1,14	1,34	Jagged 1	2	Ligand du récepteur Notch 1 impliquée dans le lignage des cellules épithéliales entérocytaires.	AHMED ET AL., 2012
Différenciation	RPS6KL1	1,20	1,85	1,16	1,40	RSK1	3	Protéine de signalisation de type phosphatase, impliquée dans le lignage des cellules mucosécrétantes.	CHOI ET AL., 2011
	PBLD	1,40	2,00	1,43	1,61	MAWBP ou STRAP		Protéine de liaison qui va se fixer à MAWD et activer la TEM.	LI ET AL., 2013
Cicatrisation / réparation	LGALS3	1,29	1,99	1,09	1,46	Galectine 3		Glycoprotéine jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire. Dans la maladie de Crohn, son expression est diminuée.	LIPPERT ET AL., 2008

Parmi les gènes sélectionnés, deux gènes surexprimés sous l'effet de la PGD2 et impliqués dans des processus de différenciation cellulaire ont été identifiés, JAG1 et RPS6KL1. JAG1 code pour la protéine *Jagged 1 ligand de Notch 1*, impliquée dans le lignage des cellules épithéliales entérocytaires. Une étude démontre que dans une colite induite par une infection bactérienne chez la souris, la balance entre la voie Wnt et Notch agit sur la prolifération et la production de mucus amenant à la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Ahmed et al., 2012). Le gène RPS6KL1 (Ribosomal Protein S6 Kinase Like 1) code pour une protéine de signalisation de type phosphatase, RSK1 impliquée dans la différenciation des cellules mucosécrétantes (Choi et al., 2011).

L'étude de l'analyse transcriptomique a aussi permis de mettre en évidence deux gènes surexprimés par la PGD2 et impliqués dans un processus de réparation / cicatrisation de la BEI. Le gène PBLD (Phenazine Biosynthesis Like Domain) qui code pour une molécule d'interaction MAWBP. La coexpression de MAWBP et MAWD inhibe la transition épithéliomésenchymateuse, qui est un processus impliqué dans la progression des cellules malignes notamment dans le cancer colorectal (Li et al., 2013). Mais dans des conditions physiologiques, la transition épithéliomésenchymateuse est un mécanisme favorisant la cicatrisation de la BEI. Le deuxième gène identifié, LGALS3 (*Lectin Galactoside-Binding Soluble, 3*) code pour la Galectine 3, une glycoprotéine jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire. Dans la maladie de Crohn, son expression est diminuée (Lippert et al., 2008).

Enfin, 3 derniers gènes impliqués dans le processus de prolifération cellulaire ont été sélectionnés :

- Un gène surexprimé : le gène SUSD2 (Shushi Domain-containing protein 2) codant pour la protéine de même nom. SUSD2 est une protéine de liaison localisée à la membrane cytoplasmique. Dans les cancers colorectaux, sa liaison avec la cytokine CSBF entrainera la diminution de la prolifération des CEI (Pan et al., 2014).
- Un gène sous-exprimé : le gène JAK3 (*Janus Kinase 3*) qui code pour une tyrosine kinase, la Janus kinase 3, impliquée dans plusieurs voies de signalisations responsables de la survie et de la prolifération cellulaire et dépendante de l'IL2 (Mishra et al., 2012).
- Et enfin un autre gène sous-exprimé : le gène DACT2 (*Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2*) codant pour la protéine Dapper Homolog 2 un modulateur important de la voie de signalisation Wnt / β -caténine (Wang et al., 2015).

(2) Choix du modèle cellulaire d'étude

Afin d'étudier l'implication de la PGD2 sur les processus contrôlant l'homéostasie de la BEI, nous avons en premier lieu validé l'expression des récepteurs DP1 et DP2 par différentes lignées cellulaires. En effet, une étude décrit une diminution, voire une abolition totale ou partielle de l'expression de ces récepteurs par les principales lignées cellulaires issues d'un adénocarcinome colorectal (Hawcroft et al., 2004). Ces données sont confirmées par nos résultats obtenus au niveau transcriptionnel à partir d'une banque de cDNA de différentes lignées de CEI. En effet, si les CEI humaines expriment DP1 et DP2, les lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome colorectal n'expriment pas DP1, hormis la lignée LS174T (figure II).

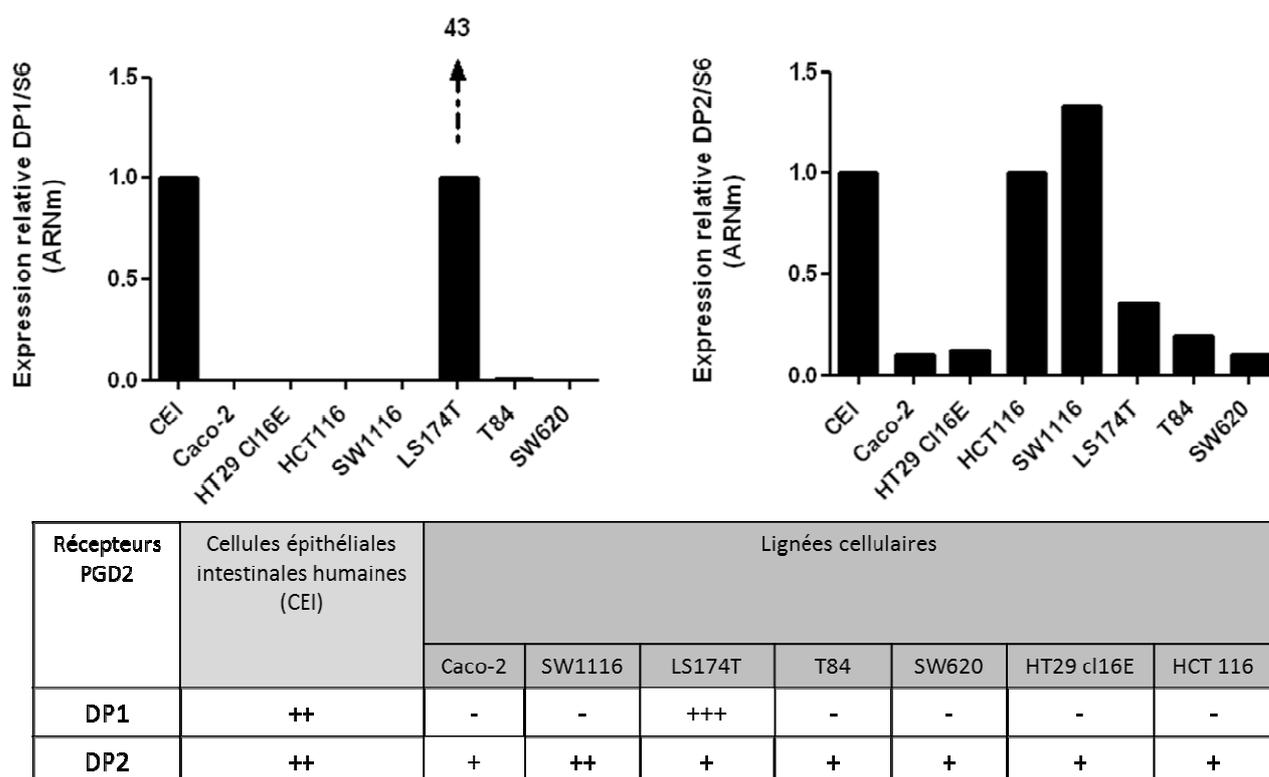


Figure II: Etude du profil d'expression de DP1 et DP2 sur cellules épithéliales intestinales et lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome colorectal.

L'expression de DP1 et DP2 a donc été vérifiée au niveau protéique à partir de lysats cellulaires de LS174T (Figure III). L'immunoempreinte DP1 et DP2 montre en révèle en effet

une bande de 40kDa correspondant au récepteur DP1 et une bande de 50kDa correspondant au récepteur DP2 (ainsi qu'une bande supplémentaire de 110kDa)

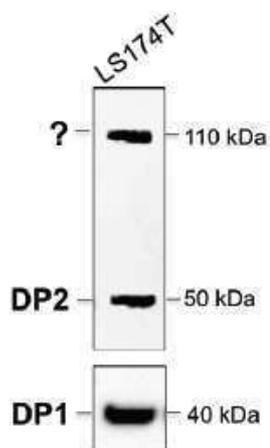


Figure III: Immunoempreinte DP1 et DP2 sur lysats cellulaires de LS174T

C'est donc la lignée LS174T que nous avons choisie comme modèle d'étude *in vitro*.

(3) Analyse transcriptionnelle des 7 gènes d'intérêts

L'étude des gènes régulés par la PGD2 a été poursuivie à partir de cultures de LS174T traitées ou non avec deux doses de 5 μ M de PGD2 à 24 h d'intervalle. L'analyse transcriptionnelle ne révèle pas d'expression significativement augmentée ou diminuée suite au traitement par la PGD2. Les résultats sont présentés en Annexe 3.

(4) Etude fonctionnelle du rôle de la PGD2 sur les cellules épithéliales intestinales

Les cellules LS174T ont été maintenues en culture et traitées ou non par 5 μ M de PGD2, dans un intervalle de 24h, à J2-3, J5-6 et J8-9. Un comptage cellulaire sur cellule de Malassez (Figure V) et une mesure de la résistance transépithéliale (Figure IV), ont été réalisés à J4, J7 et J10.

Résultats

Nous avons observé une augmentation du nombre de cellules sur filtre due à la prolifération cellulaire. Ce nombre de cellule était diminué lorsque les cellules sont traitées avec de la PGD2 mais de façon non significative. Il faudra donc augmenter le nombre de n pour confirmer cette diminution.

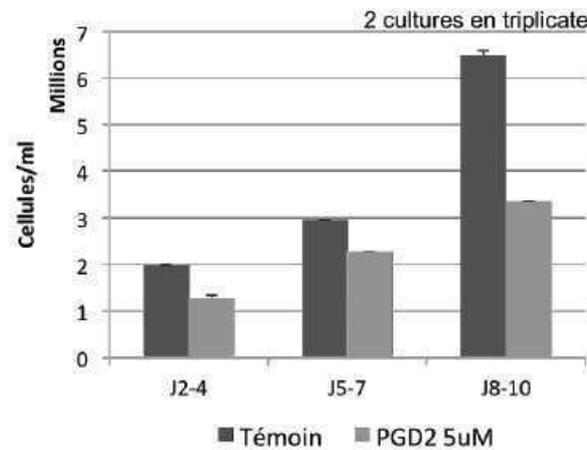


Figure IV: Comptage du nombre de cellules après traitement (5 μ M de PGD2 à 24 h d'intervalle) et en l'absence de traitement

La mesure de la résistance transépithéliale électrique a permis d'évaluer la capacité des LS174T à former une barrière intestinale en se différenciant. Cette résistance transépithéliale reflète la perméabilité de l'épithélium et traduit la mise en place des systèmes de flux para et transcellulaire entre le compartiment apical et le compartiment basal. Nous pouvons constater que la résistance n'est pas modifiée, elle reste d'environ 190 ohms (Figure V). Cette valeur correspondant à la valeur basale du filtre, la LS174T est une lignée qui ne forme pas de barrière en se différenciant. Il en est de même lorsque les cellules sont traitées avec 5 μ M de PGD2.

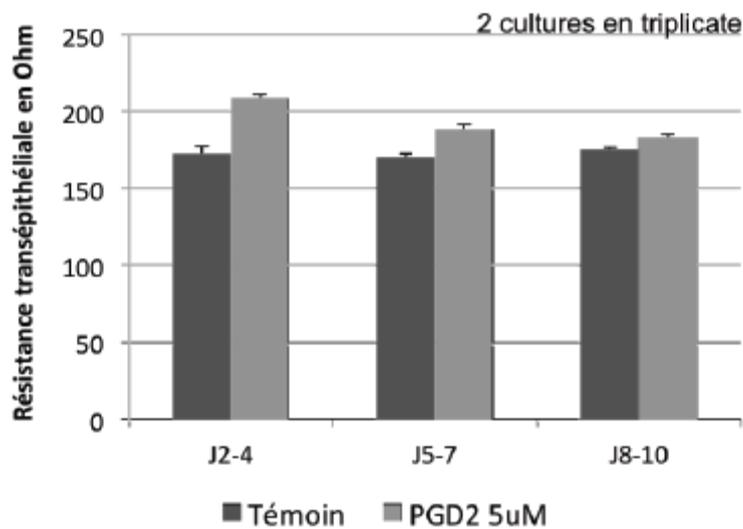


Figure V: Mesure de la résistance transépithéliale électrique après traitement (5 µM de PGD2 à 24 h d'intervalle) et en l'absence de traitement

Cette approche fonctionnelle sur le modèle LS174T, nous a tout d'abord permis de montrer, que cette lignée ne constitue pas un modèle idéal de BEI. En effet les résistances transépithéliales ne sont pas augmentées malgré l'augmentation du nombre de cellules, qu'elles soient ou non traitées avec de la PGD2. Nous montrons également qu'un traitement à la PGD2 induit une diminution du nombre de cellules. En cas de confirmation, cette diminution pourrait être le reflet de trois processus différents : une diminution de la prolifération, une augmentation de la différenciation ou bien une augmentation de la mort cellulaire. Une étude complémentaire est nécessaire afin de déterminer lequel ou lesquels de ces processus sont impliqués dans la diminution du nombre de cellules. De plus, il est nécessaire d'appréhender la voie de signalisation impliquée dans ce phénomène, sachant que la 15d-PGJ2 *via* PPAR γ est connue pour induire une diminution de la prolifération et une augmentation de la différenciation des CEI (Bach-Ngohou et al., 2010).

Discussion

I. Le SNE, source de PGD2 et PGE2 en condition inflammatoire

Les interactions fonctionnelles au sein de l'UNGE sont médiées par l'intermédiaire de nombreux médiateurs solubles issus du SNE. En effet, les CGE sont capables de synthétiser et libérer différents médiateurs solubles à proximité des CEI. Comme évoqué dans la première partie du manuscrit, ces médiateurs vont agir sur les CEI, permettant d'activer ou de réprimer des voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie de la BEI.

Nos travaux ont permis d'identifier deux nouveaux médiateurs d'origine lipidique appartenant à la classe des eicosanoïdes, à savoir la PGD2 et la PGE2. Pour cela, à partir de cultures primaires de SNE, nous avons montré par immunohistochimie qu'à la fois les neurones entériques et les CGE expriment les enzymes nécessaires à la synthèse de PGD2 et PGE2, ceci en condition basale et en particulier en condition inflammatoire, à savoir la LPGDS et la mPGES1. A notre connaissance, nos résultats montrent pour la première fois la contribution des neurones entériques et des CGE dans la production de ces PGs en réponse au stress pro-inflammatoire. En effet, bien qu'une production de PGE2 par le SNE ait déjà été caractérisée suite à l'activation de bradykinine (Murakami et al., 2003), son origine gliale ou neuronale n'avait pas été identifiée. De même, si une expression de la LPGDS par les CGE a été décrite, en particulier au sein des ganglions des plexus sous muqueux et myentériques, son expression par les neurones entériques n'avait pas encore été rapportée (Bach-Ngohou et al., 2010). Néanmoins, certaines données suggéraient fortement une expression de la LPGDS par les neurones entériques. Parmi elles, on peut citer l'analogie avec le SNC, pour lequel une expression de la LPGDS par les cellules gliales (Beuckmann et al., 2000) et certaines sous classes de neurones (Vesin et al., 1995a, 1995b) a été décrite, ainsi que leur origine embryonnaire commune avec les CGE.

La mPGES1 et la LPGDS étant exprimées par le SNE, ce dernier représente une source potentielle de PGE2 et PGD2. La production de PGE2 et PGD2 a donc été objectivée par la réalisation de dosages immuno-enzymatiques dans les surnageants de culture primaire de SNE après l'induction d'un stress inflammatoire au LPS. En ce qui concerne la PGD2, l'ajout d'un inhibiteur sélectif et compétitif de la LPGDS, l'AT56 (Irikura et al., 2009), confirme le rôle de la LPGDS dans sa production. Pour s'affranchir de la production éventuelle de ces PGs par les

Discussion

cellules musculaires lisses (les cultures primaires de SNE en étant composés d'environ 60 et 75%), nous avons utilisé dans un deuxième temps, un modèle de coculture associant uniquement neurones et CGE récemment développé au sein de l'unité (Le Berre-Scoul et al., 2017). De la même façon, les dosages ont été réalisés sur les surnageants de culture suite à un stress inflammatoire induit par l'ajout de LPS. L'utilisation de ce modèle nous a permis d'objectiver qu'à la fois les neurones et les CGE, exprimant tous deux la LPGDS, participaient bien à la production de la PGD2 en condition inflammatoire. Enfin, nous avons montré au niveau transcriptionnel l'absence d'induction des autres enzymes impliquées dans la synthèse de la PGD2 et la PGD2, à savoir la HPGDS (résultat non présenté), COX1, cPGES et mPGES2.

Les médiateurs lipidiques d'origine gliale ne se limitent pas à ces deux PGs puisque d'autres travaux au sein de l'unité, ont permis d'identifier dans les surnageants de culture de CGE : le 15-HETE et le 18-HEPE. Ces dérivés hydroxylés sont également issus de la transformation des acides gras polyinsaturés sous l'action, cette fois ci, des LOX. L'expression de la 15-LOX2, permettant la synthèse de la 15-HETE par les CGE a ainsi été mise en évidence. Dans cette étude, un rôle bénéfique sur la perméabilité de la BEI a été attribué à la 15-HETE, et ce *via* une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 (Pochard et al., 2016). La 15-HETE induirait également la croissance des CEI indifférenciées (Cabral et al., 2013). Ces dérivés hydroxylés sont aussi des ligands endogènes de PPAR γ (Altmann et al., 2007; Bull et al., 2003) et exercent des effets antiprolifératifs sur les cellules tumorales coliques (Chen et al., 2003; Nixon et al., 2004).

Ainsi, à l'image des médiateurs neuro-gliaux déjà identifiés, la PGD2 et la PGE2 apparaissent comme des acteurs potentiels pouvant être impliqués dans la relation paracrine entre SNE et BEI en condition physiologique et en situation pathologique. Il reste à préciser l'impact de leur production induite en condition inflammatoire sur la BEI, en particulier pour la PGD2. De plus, si chez des patients présentant une MC, les taux des autres médiateurs connus pour réguler les fonctions de la BEI ne semblent pas altérés, l'analyse du secrétome lipidomique montre une diminution de la production gliale de plusieurs eicosanoïdes dont la 15-HETE et la 15 d-PGJ2, connus pour leurs effets bénéfiques. Cette altération de leur production gliale est d'ailleurs associée à des altérations de leurs fonctions de régulation de la BEI et à une diminution d'expression par les CGE de la LPGDS (Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016). Elle pourrait de ce fait participer à la physiopathologie des MICI. Nous nous sommes donc intéressés aux voies métaboliques de nos deux médiateurs et à leur modulation en condition inflammatoire.

II. Une balance PGD2/PGE2

Les données de la littérature appuient l'hypothèse que les PGs peuvent être divisées en PGs à caractère pro-inflammatoire, comme la PGE2, et à caractère anti-inflammatoire, comme la PGD2. Dans ce sens, il a été montré sur modèle d'ischémie/reperfusion intestinale que la PGE2 semble impliquée dans l'induction de la réponse inflammatoire durant l'ischémie alors que la 15d-PGJ2, dérivé de la PGD2 dont la synthèse est plus tardive semble, quant à elle, participer à la résolution de l'inflammation suivant la reperfusion. Une augmentation de la PGE2 est observée rapidement après la reperfusion, avec un pic à 2 heures correspondant aux dégâts de la muqueuse, et un pic à 5 heures correspondant au recrutement des cellules immunitaires. Elle retrouve un niveau de base vers 48 heures alors que le taux de 15 d-PGJ2, connu pour son rôle dans la résolution de l'inflammation, atteint son maximum (Gobbetti et al., 2013). D'autres modèles d'études relayent de la même façon une balance PGD2/PGE2 en condition inflammatoire (Cipollone, 2008; Matsumoto et al., 1997). Concernant les MICI, les données de la littérature suggèrent également une production de PGD2 plus tardive par rapport à celle de la PGE2, mais persistante et contemporaine à la résolution de certains processus inflammatoires (Ajuebor et al., 2000; Vong et al., 2010; Zamuner et al., 2005). La cinétique de la production entre la PGE2 et la PGD2, indique un rôle différé de COX2 (Kapoor et al., 2007). De façon intéressante, sur modèle murin déficient en mPGES1, la diminution de la production de PGE2 est compensée par une augmentation de celle de la PGD2 (Montrose et al., 2015). Ainsi, l'hypothèse d'une balance PGE2/PGD2 n'est pas exclue. En effet, leur voie de synthèse étant commune, l'apparition de l'une pourrait compromettre la synthèse de l'autre, et leur cinétique d'apparition pourrait être modulée par les conditions environnantes. En tout état de cause, une relation étroite semble exister entre la synthèse de PGD2 et PGE2. En contexte inflammatoire, l'activation des récepteurs TLR *via* le LPS conduit à une activation de la voie NFκB et à une surexpression de COX2. Des mécanismes de rétrocontrôle ont d'ores et déjà été décrits, notamment sur modèle d'arthrite. Premièrement, il a été montré un rétrocontrôle négatif de la PGD2 sur sa propre voie. Sur modèle de chondrocytes, l'augmentation de l'expression de la LPGDS induite par un traitement par l'IL1β et *via* la voie NFκB est régulée par la PGD2 (Zayed et al., 2008). Deuxièmement, la 15d-PGJ2 est également connue pour réguler l'expression de la mPGES1 à la fois *via* la voie ERG-1 (*early growth response 1*) (Li et al., 2005) et *via* la voie NFκB (Bianchi et al., 2005). De façon intéressante, dans le SNE, dans une étude antérieure, nous avons montré que le 15dPGJ2 peut

inhiber la voie du NF κ B (Bach-Ngohou et al., 2010). De plus, nos résultats dans le SNE objectivent une augmentation de l'expression de la mPGES1 et de LPGDS sous l'induction de stimuli pro-inflammatoires conduisant à une surproduction de PGE2 et PGD2 (Article 1 & 2).

Au regard de ces données, nous avons donc étudié, au sein du SNE, une éventuelle modification de l'expression de la LPGDS et de la mPGES1, enzymes clé de la synthèse de la PGD2 et PGE2 en condition inflammatoire par la PGD2. Notre hypothèse de travail était la suivante : la PGD2 issue du SNE serait capable de réguler sa propre voie de synthèse et celle de la PGE2, et ce, de manière autocrine et paracrine, c'est à dire directement sur les neurones et les cellules gliales entériques (Figure 32).

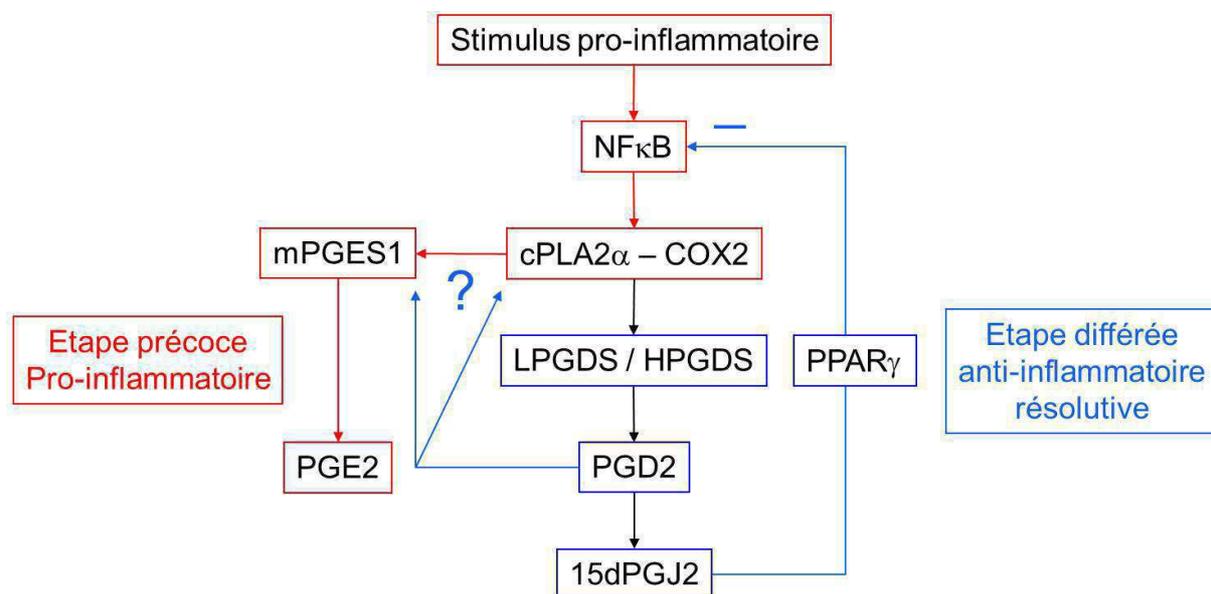


Figure 32: Hypothèse du rôle inhibiteur de la prostaglandine D2 sur sa propre voie métabolique et celle de la prostaglandine E2.

Les résultats obtenus sur la mPGES1 sont présentés dans la figure 5 de l'article 2. Les résultats obtenus sur COX2 et la LPGDS étant non significatifs ne sont pas présentés. En effet, notre modèle cellulaire *in vitro* ne nous a pas permis de démontrer que la PGD2 jouait un rôle de régulation sur sa propre synthèse, ni sur celle de la PGE2. Les médiateurs solubles et les voies de signalisation impliqués dans le contrôle de la production de PGE2 par le SNE restent donc à être déterminés. Néanmoins, si le rétrocontrôle négatif de la PGD2 sur la production de PGE2 issue du SNE n'a pas été démontré, ce rétrocontrôle pourrait agir de façon paracrine sur d'autres types cellulaires, comme les CEI. L'action de la PGD2 sur les cellules du microenvironnement sera évoquée dans un paragraphe suivant.

Discussion

Une meilleure compréhension de l'activation des voies métaboliques de la PGD2 et de la PGE2 sur biopsies coliques chez les patients MICI, en particulier durant les phases actives de la maladie, pourrait permettre de prévenir la mise en place de l'inflammation par exemple *via* une supplémentation en médiateurs pro-résolutifs.

III. Implication des voies métaboliques de la PGD2 et PGE2 dans la maladie de Crohn

Afin d'appréhender l'implication de ces 2 PGs dans la physiopathologie des MICI, nous avons étudié les modulations au niveau transcriptionnel des différents acteurs impliqués dans leurs voies métaboliques respectives à partir d'une biocollection de biopsies coliques, biologiquement et cliniquement annotés. La littérature faisant déjà état de données dans la RCH, nous avons, pour nos travaux, privilégié la MC. Ainsi, nous avons choisi des prélèvements issus de zones saines de patients ayant réalisés une coloscopie de dépistage (témoins), de patients souffrant de la MC en phase de rémission, et en phase active. Pour ce dernier groupe, ont été sélectionnés des prélèvements à la fois en zone saine (contrôle interne) et en zone ulcérée. 15 échantillons ont été sélectionnés pour chacun des groupes, soit un total de 60 échantillons.

✓ Validation du statut inflammatoire

Dans un premier temps, le statut inflammatoire de chacun des groupes a été évalué par l'étude des gènes de l'IL1 β et le TNF α . L'expression de l'IL1 β , est significativement supérieure en zone ulcérée par rapport aux biopsies réalisées en zone saine, aux biopsies de patients présentant une MC en rémission et aux biopsies de témoins. En revanche, aucune différence n'est observée entre les groupes MC quiescente, MC zone saine et témoins. Les zones coliques saines ont donc pu être considérées comme des témoins négatifs « internes » pour la majorité des patients. L'expression du TNF α , à la différence de l'IL1 β , est significativement augmentée chez les patients présentant une MC active à la fois en zone saine et en zone ulcérée par rapport aux patients classés en MC quiescente et aux sujet sains. Toutefois, 5 patients appartenant au groupe MC quiescent ont également montré une expression augmentée de TNF α . Pour ces derniers, l'étude des dossiers médicaux ne révèle aucun traitement particulier ou signes cliniques évidents. A posteriori, il aurait été intéressant de disposer dans les dossiers des patients dont sont issus la biocollection, de données clinico-biologiques plus approfondies comme le score CDAI ou encore des résultats de dosages de marqueurs de l'inflammation, comme la CRP ou la calprotectine pour interpréter ces résultats. En effet, le dosage de la calprotectine est maintenant largement réalisé en pratique clinique courante, notamment pour évaluer le risque de rechute. L'hypothèse que l'augmentation du TNF α chez ces 5 patients

soit prédictive d'une poussée inflammatoire de la pathologie aurait alors pu être vérifiée. Une analyse histologique aurait aussi été intéressante pour préciser les différents stades de l'inflammation. Néanmoins, l'ensemble de ces groupes nous a permis d'étudier la modulation de nos gènes d'intérêts en conditions physiologique et inflammatoire. Enfin, les 2 cytokines pro-inflammatoires, IL1 β et TNF α présentant des profils d'activation différents, une analyse transcriptomique sur biopsies coliques comparant le transcriptome de patient en phase active et en phase quiescente pourrait permettre d'identifier les voies de signalisation impliquées dans ces deux voies inflammatoires distinctes et de mieux appréhender la mise en place du processus inflammatoire dans les MICI.

- ✓ Mise en évidence de deux profils d'activation distincts

Nos travaux ont montré pour la première fois une activation complète de la voie métabolique de la PGD2 et de la PGE2 en zone ulcérée chez les patients présentant une MC. En effet, sur biopsies coliques de patients présentant une MC, nous avons montré au niveau transcriptionnel une augmentation de la cascade enzymatique cPLA2-COX1-COX2-LPGDS-mPGES1 dans la zone ulcérée. De plus, de façon intéressante, nous distinguons deux profils d'activation respectivement associés à l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL1 β et TNF α , avec une corrélation significative entre les différents marqueurs. Un profil d'activation dit « complet » impliquant TNF α -IL1 β -cPLA2-COX1-COX2-LPGDS-mPGES1 observé en zone ulcérée chez les patients en MC active et un profil d'activation dit « intermédiaire » impliquant TNF α -cPLA2-COX1 observé à la fois en zone saine et en zone ulcérée chez les patients MC active.

La cPLA2 est la première enzyme impliquée dans la cascade enzymatique aboutissant à la synthèse des différents eicosanoïdes dont la PGD2 et la PGE2. L'étude transcriptionnelle du gène de la cPLA2 au sein des différents groupes a montré une induction de la voie de la cPLA2 chez les patients MC quelque soit le degré d'inflammation. Récemment, à partir d'un modèle expérimental de colite sur souris déficientes en cPLA2, il a été montré une augmentation de la sévérité de l'inflammation colique (Montrose et al., 2015), suggérant un rôle protecteur des eicosanoïdes dans les MICI. Néanmoins, comme déjà évoqué, dans de nombreux modèles expérimentaux et sur biopsies coliques de patients présentant une MICI, leur synthèse a également été associée au statut pro-inflammatoire. Ainsi, le rôle des produits de la cPLA2 aux différents stades de la pathologie doit être clarifié. Au cours des MICI, il existe probablement une modulation de leur synthèse liée à une expression différentielle des acteurs

de leur voie anabolique conduisant à une dérégulation de la balance des effets anti-inflammatoires et pro-inflammatoires qui leurs sont attribués. Nos travaux se sont intéressés à la voie des COX, impliquée dans la synthèse de nos 2 médiateurs d'intérêt. Une induction de l'expression de COX2 en zone inflammatoire sur biopsies coliques de patients présentant une MC associée à une production accrue de PGs a déjà été largement décrite (McCartney et al., 1999; Reuter et al., 1996). COX2 est d'ailleurs une cible thérapeutique pour des médicaments à visée anti-inflammatoire (Chakraborti et al., 2010). De façon comparable aux résultats obtenus par l'équipe de Vong dans la RCH (Vong et al., 2010), le profil d'expression du gène COX2 que nous obtenons dans les différents groupes est superposable à celui de l'IL1 β et du TNF α avec une augmentation significative chez les patients en phase active de la maladie par rapport aux patients en rémission et aux témoins sains. Nos résultats confirment aussi que la majorité des biopsies réalisées en zone ulcérée est le siège d'une inflammation aiguë. Parmi nos résultats, il est intéressant de noter l'augmentation de l'expression de COX1, décrite comme une enzyme constitutive et en principe non impliquée dans la réponse inflammatoire (Smith et al., 2011), de façon superposable à celle du TNF α , à savoir dans les 2 groupes de patients MC active et le groupe MC quiescent. Une induction de l'expression de COX1 a déjà été décrite en condition inflammatoire et notamment dans la muqueuse gastrique où elle participait à la synthèse du thromboxane A2 (Wallace et al., 2000). Dans la MC, une augmentation de la synthèse de thromboxane A2 a été décrite dans la muqueuse rectale (Hawkey et al., 1983). Le thromboxane A2 étant connu pour son action sur l'agrégation et la vasoconstriction plaquettaire, l'activation de COX1 pourrait être importante dans la physiopathologie de la MC.

L'étude des biopsies a été poursuivie par l'analyse transcriptionnelle des gènes codant pour les deux PGDS, la LPGDS et la HPGDS ainsi que celle du gène de la mPGES1. Nous avons montré, pour la première fois, une augmentation de l'expression de la LPGDS lors d'une inflammation aiguë chez les patients présentant une MC active (MC zone saine *versus* MC zone ulcérée). L'expression de la LPGDS est donc induite en situation inflammatoire. Ces résultats concordent avec les données de la littérature. Il a été montré, sur biopsies coliques de patients présentant une RCH, une augmentation significative de l'expression de la LPGDS en zone ulcérée par rapport aux échantillons issus de zone saine chez un même patient ainsi qu'une corrélation entre l'augmentation de l'expression de la LPGDS et le stade de sévérité de la pathologie (Hokari et al., 2011). L'induction de l'expression de la LPGDS serait médiée par l'IL1- β (Fujimori et al., 2003). A l'inverse, l'expression de la HPGDS ne diffère pas entre les groupes « zone saine » et « zone ulcérée ». Au contraire, elle présente une tendance à la

diminution en fonction du statut inflammatoire. Sur biopsies coliques de RCH, l'équipe de Vong n'avait également retrouvé aucune modification d'expression de la HPGDS par rapport aux témoins (Vong et al., 2010). Ainsi, bien que la HPGDS soit la PGDS la plus exprimée au niveau intestinal par les CEI, les mastocytes et les fibroblastes (Bach-Ngohou et al., 2010; Hokari et al., 2009; Park et al., 2007), nos données et celles de la littérature suggèrent que la LPGDS joue un rôle plus important dans la physiopathologie des MICI. De plus, les modulations d'expression dans les études sur la RCH (Hokari et al., 2011; Vong et al., 2010) et nos résultats dans la MC, sensiblement similaires, suggèrent un processus commun pour ces deux pathologies, potentiellement impliqué dans leur pathogénèse.

La mise en évidence de l'augmentation de la LPGDS en zone ulcérée, enzyme clé de la synthèse de la PGD2 en condition inflammatoire, et exprimée par le SNE, conforte les données obtenues *in vivo* et suggèrent la production de PGD2. Il en est de même pour la mPGES1 et la production de PGE2. En effet, nous avons montré une augmentation de l'expression de la mPGES1 lors d'une inflammation aigüe chez les patients présentant une MC active (MC zone saine *versus* MC zone ulcérée). Une augmentation de l'expression de la mPGES1 sur muqueuse colique inflammatoire, associée à des taux importants de PGE2, a déjà été décrite sur des modèles murins de colite (Alhouayek et al., 2018; Matsumoto et al., 1997). Des dosages de PGE2 dans les surnageants des biopsies de notre biocollection n'ont pas été réalisés, plusieurs études faisant déjà état de taux plus importants de PGE2 sur muqueuses coliques en condition inflammatoire (Alhouayek et al., 2018; Sharon et al., 1978; Vong et al., 2010; Wiercinska-Drapalo et al., 1999; Sturm et al., 2014). D'ailleurs, l'observation de ces taux importants est probablement à mettre en lien avec l'induction de la mPGES1 que nous décrivons. Par contre, nous avons réalisé des dosages de PGD2 sur les surnageants de biopsies pour objectiver la production de PGD2. Aucune différence significative n'a été relevée (résultat non présenté). L'hypothèse d'une dégradation rapide et connue de la PGD2 a été évoquée d'autant plus que les surnageants étaient conservés pour certains à -80°C depuis 2005. Les dosages de PGD2 ont donc ensuite été réalisés sur biopsies coliques entières, à la fois en zone saine et en zone ulcérée, à partir de prélèvements récents chez 7 patients présentant une MC active. Les résultats obtenus ont permis de confirmer une augmentation de la production de PGD2 en zone ulcérée par rapport à la zone saine, ceci de façon cohérente avec l'augmentation de l'expression de la LPGDS que nous avons observée.

Au final, nous avons montré, à partir de notre biocollection, l'implication des voies LPGDS/PGD2 et mPGES1/PGE2 dans la physiopathologie des MICI. Néanmoins, la part pro ou anti-inflammatoire des PGs reste difficile à définir, probablement du fait de la multiplicité des cibles cellulaires et de leurs récepteurs pour lesquels ils existent des différentes voies de signalisation pouvant être activées (Milatovic et al., 2011; Wallace, 2001).

✓ Etude du profil des récepteurs de la PGD2

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des récepteurs de la PGD2, dont PPAR γ puisque son principal ligand naturel, la 15d-PGJ2, est un dérivé de la PGD2.

L'analyse de l'expression de PPAR γ au sein des différents groupes montre une diminution significative de son expression lors d'une inflammation aiguë pour les patients atteints de MC. En effet, l'expression de PPAR γ est deux fois plus faible dans les prélèvements réalisés en zone ulcérée chez ces patients. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (concernant la RCH) pour laquelle il a déjà rapporté une diminution de l'expression de PPAR γ lors de la phase active de la maladie (Bouguen et al., 2015; Dubuquoy et al., 2000). Ainsi, un défaut d'expression de la voie de signalisation anti-inflammatoire PPAR γ pourrait être l'un des éléments de la physiopathologie des MICI (Jiang et al., 1998). En effet, une étude récente suggère que PPAR γ pourrait être un gène de susceptibilité pour la MC (Sugawara et al., 2005). A ces données s'ajoute celle d'une étude récente attribuant à PPAR γ un rôle bénéfique à la fois sur le maintien de l'intégrité de la couche de mucus et sur les jonctions serrées *via* un mécanisme dépendant de la MLCK (Zhao et al., 2018), pour lesquelles des altérations ont été décrites dans les MICI. Nous avons confirmé une diminution de l'expression de PPAR γ en condition inflammatoire sur une lignée de CEI dérivée d'adénocarcinome colorectal, HT29, traité par TNF α ou IFN γ (Donnée non publiée) (Figure 33).

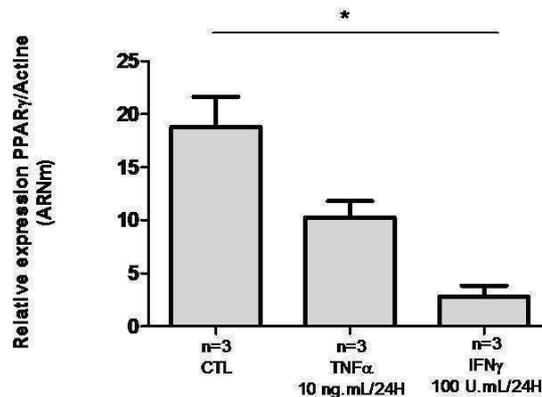


Figure 33: Diminution relative de la voie bénéfique PPAR γ en condition inflammatoire sur modèle de CEI (Test non paramétrique de Kruskal Wallis et post test de Dunn's, * $p < 0,5$)

A l'inverse, l'analyse transcriptionnelle de DP1 et DP2 ne montre aucune différence d'expression entre le groupe MC zone saine et MC zone ulcérée. L'expression de ces 2 gènes est donc maintenue en condition inflammatoire. Dans le cadre des RCH, une absence de variation de l'expression de DP2 sur biopsies coliques a également été décrite (Vong et al., 2010). Par contre, nos résultats sur biopsies de MC sont différents de ceux obtenus par Vong et ses collègues sur biopsies de RCH. Ces derniers ont mis en évidence une augmentation de l'expression de DP1 chez des patients en rémission, ce qui les avait conduit à l'hypothèse d'un effet bénéfique de la PGD2 *via* le récepteur DP1 (Vong et al., 2010). Cette différence peut être en partie due aux critères utilisés pour définir la phase quiescente de la maladie. En effet, dans l'étude de Vong sur biopsies de RCH, aucun patient dit « en rémission » n'avait eu besoin d'un traitement depuis plus de quatre ans or, dans notre travail, seulement 5 patients sur 15 étaient exempts de traitement. Les données de la littérature présentés dans ce manuscrit soulignent la dualité de la PGD2 quant à son rôle anti- ou pro-inflammatoire. Le versant bénéfique de la PGD2 semble lié aux voies de signalisation médiées par DP1 et PPAR γ , et le versant pro-inflammatoire aux voies de signalisation médiées par DP2. Une étude toute récente sur modèle de colite induite souligne de nouveau l'action anti-inflammatoire de la PGD2 *via* ses récepteurs DP1 et PPAR γ (Alhouayek et al., 2018). Cette dualité semble liée à une expression différentielle de ses récepteurs par les cellules épithéliales intestinales et par les cellules immunocompétentes environnantes, en conditions physiologique et inflammatoire. Une diminution de l'expression des récepteurs DP1 et DP2 a déjà été décrite en relation avec le stade de différenciation et de progression (Gustafsson et al., 2007). Ces résultats justifient donc d'étudier plus en profondeur l'effet de la PGD2 sur la BEI *via* ses récepteurs DP1 et DP2.

✓ Etude du profil des récepteurs de la PGE2

En ce qui concerne l'expression des récepteurs de la PGE2, seule l'expression des gènes des récepteurs EP1 et EP4 a été étudiée au sein des différents groupes. En effet, ces 2 récepteurs sont impliqués dans les mécanismes de rupture d'intégrité de la BEI (Martinez-Cutillas et al., 2014; Rodríguez-Lagunas et al., 2010; Safdari et al., 2016), connus pour être l'un des facteurs déclenchants dans les MICI. Nous avons observé une augmentation de l'expression d'EP1 pour l'ensemble des patients MC (quiescents et actifs) en comparaison aux sujets sains. Cette dernière est donc indépendante du statut inflammatoire. En revanche, l'expression du récepteur EP4 n'est augmentée que chez les patients MC actifs en comparaison aux patients MC quiescents. Il est intéressant de noter que son expression au sein des différents groupes suit celle du TNF α , connu pour être impliqué dans la rupture de la BEI (Wang et al., 2005b). D'autre part, la PGE2 *via* son récepteur EP4 induit à une augmentation de l'expression d'IL8 par les CEI, contribuant ainsi à amplifier la réponse inflammatoire (Dey et al., 2009; Yu and Chadee, 1998). Enfin, il a été montré que la différenciation des CEI induit une diminution de l'expression de COX2 et de la synthèse de PGE2, ceci parallèlement à la réduction de la perméabilité paracellulaire (Martín-Venegas et al., 2006). La PGE2 augmenterait donc la perméabilité paracellulaire. Ainsi, la PGE2, notamment par l'intermédiaire d'EP4 participerait au processus de rupture d'intégrité de la BEI décrite dans les MICI. Des études complémentaires doivent être menées afin de définir les diverses fonctions médiées par les récepteurs de la PGE2, à la fois sur les CEI et sur les autres cellules du microenvironnement, ceci en conditions physiologique et inflammatoire, la PGE2 étant également essentielle pour l'homéostasie de la BEI (Belley and Chadee, 1999; Willemsen et al., 2003).

IV. Rôle de la PGD2 sur la BEI en conditions physiologique et inflammatoire

Nous avons montré une augmentation de la production de la PGD2 et la PGE2 en condition inflammatoire par le SNE et l'implication de leur voie métabolique dans la physiopathologie des MICI. Si l'impact de la production de la PGE2 sur la BEI a été en partie décrypté, les données concernant la PGD2 sont à la fois peu nombreuses et controversées.

✓ Des limites des modèles de BEI à l'étude à la transcriptomique

Nos travaux sur l'impact de la PGD2 sur la BEI se sont heurtés à l'absence de modèle *in vitro* de BEI permettant l'étude des différentes fonctions médiées par DP1 et DP2. En effet, si DP2 est exprimé par l'ensemble des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome colorectal étudiées, de façon surprenante seule la lignée LS174T exprime DP1. Une extinction relative de l'expression de DP1 sur biopsies de sujets présentant un cancer colorectal a été décrite, ce qui peut expliquer en partie l'absence d'expression sur ces différentes lignées dérivées d'adénocarcinome colorectal (Gustafsson et al., 2007). Cependant, les mécanismes impliqués dans ce défaut d'expression ne sont pas connus et n'ont pas été étudiés. Ils pourraient être liés à des altérations génétiques ou des modifications épigénétiques. La mise en évidence d'une importante expression de DP1 par la lignée LS174T est probablement à mettre en relation avec son caractère muco-sécrétoire puisque le récepteur DP1 est impliqué dans la régulation des mucines MUC2 et MUC5A (Wright et al., 2000). Malgré l'expression conservée de DP1 par cette lignée, LS174T ne constitue pas un bon modèle cellulaire de BEI car elle ne forme pas de monocouche. Elle nous a cependant permis d'étudier les voies de signalisation activées par DP1 au niveau transcriptionnel, mises en exergue par l'analyse transcriptomique. Nous ne disposons que donc de modèles de BEI exprimant exclusivement DP2 dont la lignée Caco-2. Cette dernière a déjà été utilisée lors de travaux antérieurs de notre unité portant sur les fonctions de la BEI (Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016; Pochard et al., 2016) et, dans d'autres équipes, pour étudier les processus de rupture d'intégrité de la barrière (Rodríguez-Lagunas et al., 2010). Ce modèle a d'ailleurs permis à notre équipe de suggérer l'implication de la 15d-PGJ2 et du

11 β PGF2 α , dérivés de la PGD2 dans l'augmentation de l'étalement et la réparation épithéliale *via* DP2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016).

Face à l'absence de modèle cellulaire adapté, et une littérature quasi inexistante sur les voies de signalisation potentielles DP1 et DP2 dépendantes dans le contexte clinique des MICI, une étude transcriptomique pan-génomique a été menée. Elle avait pour objectif de mettre en évidence des gènes ou fonctions cibles médiées par les récepteurs DP1 et DP2. La hiérarchisation des données, n'a malheureusement pas permis de discriminer les deux conditions (traitement PGD2 *versus* absence de traitement), mais au contraire de classer les gènes par individu. Ces résultats démontrent une importante hétérogénéité entre les différents patients. Pour s'affranchir de ce biais, il faudrait réitérer cette analyse transcriptomique sur un nombre plus important de patients. La culture d'explants est un modèle qui permet de conserver l'architecture tridimensionnelle et les interactions entre les cellules résidentes de la muqueuse (Jarry et al., 2008), telles que les CEI, les cellules immunitaires ou les fibroblastes. Les récepteurs à la PGD2, DP1 et DP2 sont exprimés non seulement par les cellules épithéliales mais aussi par les monocytes et les éosinophiles (Gosset et al., 2003). Ainsi, les résultats obtenus témoignent également de l'hétérogénéité des fragments de muqueuse qui présentent des contingents cellulaires différents. D'où la nécessité, d'étudier également le rôle de la PGD2 directement sur un modèle de CEI, et en particulier pour les études complémentaires à mener sur l'implication des 7 gènes cibles d'intérêt mis en relief dans ce travail. Une nouvelle étude transcriptomique, cette fois sur CEI transfectées en DP1 pourrait d'ailleurs être réalisée afin de confirmer leur éventuelle implication. De façon intéressante, ces gènes interviennent dans les fonctions de prolifération, de différenciation et de réparation de la BEI, pour lesquelles nos équipes ont d'ores et déjà montré l'implication des dérivés de la PGD2 par l'intermédiaire de la voie PPAR γ et/ou DP2 (Bach-Ngohou et al., 2010; Coquenlorge et al., 2016). D'autre part, le développement au sein de l'unité d'une approche innovante associée à l'utilisation de cellules souches et permettant de générer de mini-intestins ou organoïdes intestinaux offre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre l'implication de la PGD2 dans les MICI (Mahe et al., 2017).

✓ PGD2 et les cellules immunocompétentes du microenvironnement

Si le rôle de la PGD2 sur la BEI est encore peu connu, des travaux au sein de notre groupe ont mis en évidence des effets neuroprotecteurs de la 15d-PGJ2 d'origine gliale. En effet, la 15d-PGJ2 prévient la mort neuronale induite par un stress oxydant dans les cultures

de cellules de neuroblastome humain, ainsi que dans des cultures primaires de SNE (Abdo et al., 2012). Un rôle dans la régulation de la neurotransmission a également été décrit pour la PGD2. Elle inhiberait la sécrétion d'acétylcholine induite par une stimulation électrique (Diener et al., 1992) alors que la PGE2 l'augmenterait (Mulholland and Simeone, 1993). Toutefois, les actions de la PGD2 dont la synthèse est induite en condition inflammatoire par le SNE ne se limitent probablement pas à celles exercées sur les composants de l'UNGE. Le microbiote intestinal, les cellules endothéliales et immunitaires, les fibroblastes ou encore les cellules musculaires pourraient être impactés. En effet, des travaux récents montrent une expression différentielle des récepteurs DP1 et DP2 par les cellules de l'immunité présentes sur le site de l'inflammation, dans les biopsies de patients présentant une RCH active en comparaison aux sujets sains (Sturm et al., 2014). Il faut distinguer ainsi les effets directs de la PGD2 sur les CEI par l'activation de ses récepteurs, de ses effets sur les cellules immunocompétentes environnantes, en particulier sur la régulation de leur recrutement. L'implication de la PGD2 dans la physiopathologie des MICI pourrait être liée à son rôle sur les cellules de l'immunité, d'autant plus que le développement des MICI est associé à une infiltration des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, ainsi que de monocytes au niveau du côlon (Strober et al., 2007). Dans ce sens, il a été montré sur modèle murin de RCH que l'inhibition de DP2 mais pas de DP1, conduisait à une inflammation plus importante et inhibait l'afflux de polynucléaires neutrophiles et lymphocytes sur le lieu de l'inflammation, suggérant que DP2 régule le niveau d'infiltration leucocytaire au niveau du côlon (Sturm et al., 2014). En ce qui concerne les polynucléaires neutrophiles, il a également été montré sur modèle murin de sepsis sévère, après ligature et perforation du cæcum, une participation de DP2 dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles (Ishii et al., 2012). D'autre part, un modèle de colite induite chez le rat montre que DP1, participe aussi à la diminution de l'infiltrat granulocytaire via son récepteur DP1 (Ajuebor et al., 2000). Dans ce modèle, l'inactivation de DP2 est associée à une suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires, à l'induction de la production de l'IL10, et à une augmentation du recrutement au niveau péritonéal des neutrophiles *via* le récepteur aux chimiokines CXCR2, dont l'activation induit leur migration et leur activation.

En ce qui concerne les polynucléaires éosinophiles, une infiltration a été rapportée dans les zones inflammatoires chez des patients atteints de MC et RCH avec un taux d'infiltration corrélé à la sévérité de la maladie (Lampinen et al., 2008; Smyth et al., 2013). Deux études récentes se sont donc intéressées au rôle de la PGD2 sur les polynucléaires éosinophiles, ces derniers exprimant fortement les récepteurs DP1 et DP2 (Schratl et al., 2007). Elles montrent

Discussion

sur biopsies coliques de patient présentant une RCH et une MC, une augmentation de l'expression de DP2 en comparaison aux biopsies coliques de sujets sains (Radnai et al., 2016; Sturm et al., 2014). Les travaux de Radnai et de ses collaborateurs montrent également une diminution du recrutement des polynucléaires éosinophiles suite à l'utilisation d'un inhibiteur de DP2 (OC-459). Cette diminution s'accompagne d'une diminution de la réponse inflammatoire, avec une réduction des taux de TNF α , IL1 β , et IL6 (Radnai et al., 2016). La diminution des taux de TNF α , IL1 β , et IL6 décrite est probablement liée à une inhibition du recrutement des macrophages et des lymphocytes T sur le lieu de l'inflammation. En effet, ces cytokines produites lors de colite par les lymphocytes TH2 et les macrophages sont activés par l'administration d'un agoniste de DP2 (Xue et al., 2005).

Ces différentes données confortent le rôle pro-inflammatoire des polynucléaires éosinophiles dans les MICI et suggèrent que les antagonistes de DP2 pourraient être une option thérapeutique intéressante, comme c'est déjà le cas, par exemple, dans l'asthme allergique.

Conclusion générale & perspectives

Ces travaux, combinant des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une approche transcriptomique, ont permis d'identifier le SNE comme une source de PGD2 et PGE2 en condition inflammatoire, et de renforcer l'implication des voies métaboliques de la PGD2 et PGE2 dans la physiopathologie des MICI (Article 1 & 2). Ces données s'accordent avec la place que semble jouer le SNE dans la physiopathologie des MICI et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour prévenir la rupture de l'intégrité de la BEI au cours de ces maladies. En effet, la mise en évidence d'une induction de l'expression de la LPGDS au sein de biopsies effectuées en zones ulcérées chez des patients atteints d'une MC en phase active associée à une diminution de l'expression de PPAR γ conforte l'hypothèse de l'implication de la PGD2 dans la physiopathologie de la MC. Il en est de même pour la PGE2, avec la mise en évidence de l'induction de la mPGES1 associée à une augmentation de l'EP4 en zones ulcérées chez les patients atteints d'une MC en phase active. D'autre part, nos travaux apportent un éclairage sur l'origine de la PGD2 et la PGE2 au niveau de la muqueuse intestinale puisque nous avons montré une origine neuro-gliale de ces PGs en condition inflammatoire. Si cette part de production est probablement minime par rapport à la production épithéliale, son impact fonctionnel n'est pas forcément moindre. Néanmoins, l'impact bénéfique ou délétère de cette production reste à éclaircir, en particulier pour la PGD2. L'hypothèse d'une dérégulation de la synthèse des PGs ainsi que d'un rôle variable en fonction du stade d'avancement de la pathologie n'est pas exclue. En tout état de cause, une étude approfondie de l'implication de DP1 et DP2 sur la BEI pourrait permettre à terme l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes de ces récepteurs dans le traitement des MICI. Pour exemple, de nombreux antagonistes de DP2 ont d'ores et déjà été développés pour le traitement de l'asthme. Par ailleurs, si un effet bénéfique pour la PGD2, dérivant du métabolisme des oméga 6, est vraiment démontré sur la BEI, des dérivés d'oméga 6 pourraient être utilisés en traitement préventif dans les MICI.

Bibliographie

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

Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J. Physiol. (Lond.)* *590*, 2739–2750.

Ahmed, I., Chandrakesan, P., Tawfik, O., Xia, L., Anant, S., and Umar, S. (2012). Critical roles of Notch and Wnt/ β -catenin pathways in the regulation of hyperplasia and/or colitis in response to bacterial infection. *Infect. Immun.* *80*, 3107–3121.

Ajuebor, M.N., Singh, A., and Wallace, J.L. (2000). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D₂ is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* *279*, G238–G244.

Alhouayek, M., Buisseret, B., Paquot, A., Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G.G. (2018). The endogenous bioactive lipid prostaglandin D₂-glycerol ester reduces murine colitis via DP1 and PPAR γ receptors. *The FASEB Journal* fj.201701205R.

Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., and Ma, T.Y. (2013). TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1. *Am. J. Pathol.* *183*, 1871–1884.

Altmann, R., Hausmann, M., Spöttl, T., Gruber, M., Bull, A.W., Menzel, K., Vogl, D., Herfarth, H., Schölmerich, J., Falk, W., et al. (2007). 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPAR γ in human colonic epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 612–622.

Ananthkrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *12*, 205–217.

Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 808–814.

Andoh, A., Imaeda, H., Aomatsu, T., Inatomi, O., Bamba, S., Sasaki, M., Saito, Y., Tsujikawa, T., and Fujiyama, Y. (2011). Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gastroenterol.* *46*, 479–486.

Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S.V., Gewirtz, A.T., and Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* *143*, 1006-1016.e4.

Arai, Y., Matsuura, T., Matsuura, M., Fujiwara, M., Okayasu, I., Ito, S., and Arihiro, S. (2016). Prostaglandin E-Major Urinary Metabolite as a Biomarker for Inflammation in Ulcerative Colitis: Prostaglandins Revisited. *Digestion* *93*, 32–39.

- Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2: Soluble glial mediators effects on intestinal epithelial cells. *The Journal of Physiology* 588, 2533–2544.
- Balsinde, J., Winstead, M.V., and Dennis, E.A. (2002). Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531, 2–6.
- Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., and Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 1013–1023.
- Baudry, C., Reichardt, F., Marchix, J., Bado, A., Schemann, M., des Varannes, S.B., Neunlist, M., and Moriez, R. (2012). Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 533–544.
- Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627–1640.
- Belley, A., and Chadee, K. (1999). Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor. *Gastroenterology* 117, 1352–1362.
- Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435.
- Beuckmann, C.T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (1999). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) binds non-substrate lipophilic ligands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469, 55–60.
- Beuckmann, C.T., Lazarus, M., Gerashchenko, D., Mizoguchi, A., Nomura, S., Mohri, I., Uesugi, A., Kaneko, T., Mizuno, N., Hayaishi, O., et al. (2000). Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 428, 62–78.
- Bianchi, A., Moulin, D., Sebillaud, S., Koufany, M., Galteau, M.-M., Netter, P., Terlain, B., and Jouzeau, J.-Y. (2005). Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1325-1337.
- Blackwell, K.A., Raisz, L.G., and Pilbeam, C.C. (2010). Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 294–301.
- Blais, A., Aymard, P., and Lacour, B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflugers Arch.* 434, 300–305.

- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* *63*, 229–241.
- Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Metters, K.M., and Abramovitz, M. (1995). Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 18910–18916.
- Bonaz, B., Sinniger, V., and Pellissier, S. (2017). Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* *282*, 46–63.
- Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil.* *16 Suppl 1*, 34–38.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., and Tracey, K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* *405*, 458–462.
- Bouguen, G., Langlois, A., Djouina, M., Branche, J., Koriche, D., Dewaeles, E., Mongy, A., Auwerx, J., Colombel, J.-F., Desreumaux, P., et al. (2015). Intestinal steroidogenesis controls PPAR γ expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis. *Gut* *64*, 901–910.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* *53*, 222–228.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Geerling, I., Reinshagen, M., Schäfer, K.H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006a). Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *12*, 346–354.
- von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2006b). Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 820–825.
- von Boyen, G.B.T., Degenkolb, N., Hartmann, C., Adler, G., and Steinkamp, M. (2010). The endothelin axis influences enteric glia cell functions. *Med. Sci. Monit.* *16*, BR161-167.
- von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* *11*, 3.
- Brégeon, J., Neunlist, M., Bossard, C., Biraud, M., Coron, E., Bourreille, A., and Meurette, G. (2015). Improvement of Refractory Ulcerative Proctitis With Sacral Nerve Stimulation. *J. Clin. Gastroenterol.* *49*, 853–857.
- Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., and Breyer, M.D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 661–690.
- Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., et al. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal

- inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 145, 1323–1333.
- Buisine, M.P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M.C., Colombel, J.F., Porchet, N., and Aubert, J.P. (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 49, 544–551.
- Bull, A.W., Steffensen, K.R., Leers, J., and Rafter, J.J. (2003). Activation of PPAR gamma in colon tumor cell lines by oxidized metabolites of linoleic acid, endogenous ligands for PPAR gamma. *Carcinogenesis* 24, 1717–1722.
- Burke, J.E., and Dennis, E.A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50 *Suppl*, S237-242.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189–201.
- Cabarrocas, J., Savidge, T.C., and Liblau, R.S. (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41, 81–93.
- Cabral, M., Martín-Venegas, R., and Moreno, J.J. (2013). Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1620–1628.
- Chan, W.W., and Mashimo, H. (2013). Lubiprostone Increases Small Intestinal Smooth Muscle Contractions Through a Prostaglandin E Receptor 1 (EP1)-mediated Pathway. *J Neurogastroenterol Motil* 19, 312–318.
- Chandrasekharan, N.V., and Simmons, D.L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 5, 241.
- Chandrasekharan, B., Jeppsson, S., Pienkowski, S., Belsham, D.D., Sitaraman, S.V., Merlin, D., Kokkotou, E., Nusrat, A., Tansey, M.G., and Srinivasan, S. (2013). Tumor necrosis factor-neuropeptide Y cross talk regulates inflammation, epithelial barrier functions, and colonic motility. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 2535–2546.
- Chen, G.G., Xu, H., Lee, J.F.Y., Subramaniam, M., Leung, K.L., Wang, S.H., Chan, U.P.F., and Spelsberg, T.C. (2003). 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid arrests growth of colorectal cancer cells via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Int. J. Cancer* 107, 837–843.
- Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., and Neunlist, M. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 1963–1975.
- Chew, T.S., and Mansfield, J.C. (2018). Can faecal calprotectin predict relapse in inflammatory bowel disease: a mini review. *Frontline Gastroenterol* 9, 23–28.
- Choi, Y.H., Lee, S.-N., Aoyagi, H., Yamasaki, Y., Yoo, J.-Y., Park, B., Shin, D.M., Yoon, H.-G., and Yoon, J.-H. (2011). The Extracellular Signal-regulated Kinase Mitogen-activated Protein Kinase/Ribosomal S6 Protein Kinase 1 Cascade Phosphorylates cAMP Response Ele-

- ment-binding Protein to Induce *MUC5B* Gene Expression via d-Prostanoid Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34199–34214.
- Cipollone, F. (2008). The balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, e1.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., and Cuomo, R. (2011). Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, e372-382.
- Claar, D., Hartert, T.V., and Peebles, R.S. (2015). The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. *Expert Rev Respir Med* 9, 55–72.
- Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154, 274–284.
- Clevers, H., Loh, K.M., and Nusse, R. (2014). Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346, 1248012.
- Coelho-Aguiar, J. de M., Bon-Frauches, A.C., Gomes, A.L.T., Veríssimo, C.P., Aguiar, D.P., Matias, D., Thomasi, B.B. de M., Gomes, A.S., Brito, G.A. de C., and Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: identity and functions. *Glia* 63, 921–935.
- Coquenlorge, S., Van Landeghem, L., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Duchalais, E., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). The arachidonic acid metabolite 11 β -ProstaglandinF2 α controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci Rep* 6, 25203.
- Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13306–13311.
- Cosnes, J. (2008). What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm. Bowel Dis.* 14 Suppl 2, S14-15.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- Cuzzocrea, S., Ianaro, A., Wayman, N.S., Mazzon, E., Pisano, B., Dugo, L., Serraino, I., Di Paola, R., Chatterjee, P.K., Di Rosa, M., et al. (2003). The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 138, 678–688.
- De Filippis, D., Russo, A., De Stefano, D., Cipriano, M., Esposito, D., Grassia, G., Carnuccio, R., Russo, G., and Iuvone, T. (2014). Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation in rat chronic granulomatous inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 725, 64–69.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englaro, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., et al. (2001). Attenuation of colon in-

flammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* *193*, 827–838.

Dey, I., Lejeune, M., and Chadee, K. (2006). Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology* *149*, 611–623.

Dey, I., Giembycz, M.A., and Chadee, K. (2009). Prostaglandin E(2) couples through EP(4) prostanoid receptors to induce IL-8 production in human colonic epithelial cell lines. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 475–485.

Diener, M., Nobles, M., Schmitt, C., and Rummel, W. (1992). Characterization of the antise-cretory action of prostaglandin D₂ in the rat colon. *Acta Physiol. Scand.* *145*, 19–24.

Dubuquoy, L., Bourdon, C., Peuchmaur, M., Leibowitz, M.D., Nutten, S., Colombel, J.F., Auwerx, J., and Desreumaux, P. (2000). [Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: a new target for the treatment of inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *24*, 719–724.

Eguchi, Y., Eguchi, N., Oda, H., Seiki, K., Kijima, Y., Matsu-ura, Y., Urade, Y., and Hayai-shi, O. (1997). Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 14689–14694.

Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., and Al-Salami, H. (2014). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res* *7*, 113–120.

Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* *24*, 2143–2155.

Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahé, M.M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J.P., et al. (2011). Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* *60*, 473–484.

van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 241–260.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* *83*, 803–812.

Forsberg, L., Leeb, L., Thorén, S., Morgenstern, R., and Jakobsson, P. (2000). Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.* *471*, 78–82.

Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 55–70.

Fujimori, K., Fujitani, Y., Kadoyama, K., Kumanogoh, H., Ishikawa, K., and Urade, Y. (2003). Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1

- through E-box and interleukin-1 beta via two NF-kappa B elements in rat leptomeningeal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6018–6026.
- Fujitani, Y., Kanaoka, Y., Aritake, K., Uodome, N., Okazaki-Hatake, K., and Urade, Y. (2002). Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.* 168, 443–449.
- Fukata, M., and Arditi, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 6, 451–463.
- Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 286–294.
- Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18.
- Gabella, G. (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* 30 Suppl, S59-66.
- Garcia, C.M., Darland, D.C., Massingham, L.J., and D'Amore, P.A. (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 152, 25–38.
- Garg, M., Lubel, J.S., Sparrow, M.P., Holt, S.G., and Gibson, P.R. (2012). Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36, 324–344.
- Garrod, D.R., Merritt, A.J., and Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 537–545.
- Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., and Desmet, V.J. (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103, 439–447.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2907–2917.
- Gerding, D.N., Meyer, T., Lee, C., Cohen, S.H., Murthy, U.K., Poirier, A., Van Schooneveld, T.C., Pardi, D.S., Ramos, A., Barron, M.A., et al. (2015). Administration of Spores of Nontoxicogenic *Clostridium difficile* Strain M3 for Prevention of Recurrent *C difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 313, 1719.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., McMASTER, S., Sawatzky, D.A., Willoughby, D.A., and Lawrence, T. (2003). Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy Δ^{12-14} PGJ₂ brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *The FASEB Journal* 17, 2269–2271.
- Glasser, A.L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M.H., Colombel, J.F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's

- disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* *69*, 5529–5537.
- Gobbetti, T., Le Faouder, P., Bertrand, J., Dubourdeau, M., Barocelli, E., Cenac, N., and Vergnolle, N. (2013). Polyunsaturated fatty acid metabolism signature in ischemia differs from reperfusion in mouse intestine. *PLoS ONE* *8*, e75581.
- Gosset, P., Bureau, F., Angeli, V., Pichavant, M., Faveeuw, C., Tonnel, A.-B., and Trottein, F. (2003). Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J. Immunol.* *170*, 4943–4952.
- Gould, S.R., Brash, A.R., and Conolly, M.E. (1977). Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet* *2*, 98.
- Goyal, R.K., and Hirano, I. (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* *334*, 1106–1115.
- Graham, D.Y., Agrawal, N.M., and Roth, S.H. (1988). Prevention of NSAID-induced gastric ulcer with misoprostol: multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* *2*, 1277–1280.
- Grasa, L., Arruebo, M.P., Plaza, M.A., and Murillo, M.D. (2006). PGE(2) receptors and their intracellular mechanisms in rabbit small intestine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *79*, 206–217.
- Greenhough, A., Smartt, H.J.M., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* *30*, 377–386.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., and Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb Exp Pharmacol* *239*, 1–16.
- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *9*, 625–632.
- Günther, C., Neumann, H., Neurath, M.F., and Becker, C. (2013). Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* *62*, 1062–1071.
- Gustafsson, A., Hansson, E., Kressner, U., Nordgren, S., Andersson, M., Lönnroth, C., and Lundholm, K. (2007). Prostanoid receptor expression in colorectal cancer related to tumor stage, differentiation and progression. *Acta Oncol* *46*, 1107–1112.
- Hagiwara, C., Tanaka, M., and Kudo, H. (2002). Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *17*, 758–764.
- Hällgren, A., Flemström, G., and Nylander, O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am. J. Physiol.* *275*, G95–103.
- Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* *7*, 494–506.

- Hammad, H., Kool, M., Soullié, T., Narumiya, S., Trottein, F., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2007). Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *204*, 357–367.
- Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* *92*, 105–113.
- Hansson, G.C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 57–62.
- Hara, S., Kamei, D., Sasaki, Y., Tanemoto, A., Nakatani, Y., and Murakami, M. (2010). Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie* *92*, 651–659.
- Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* *103*, 147–166.
- Hawcroft, G., Gardner, S.H., and Hull, M.A. (2004). Expression of prostaglandin D2 receptors DP1 and DP2 by human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* *210*, 81–84.
- Hawkey, C.J., Karmeli, F., and Rachmilewitz, D. (1983). Imbalance of prostacyclin and thromboxane synthesis in Crohn's disease. *Gut* *24*, 881–885.
- Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 466–479.
- Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., et al. (2001). Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* *193*, 255–261.
- Hoehner, J.C., Wester, T., Pählman, S., and Olsen, L. (1996). Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* *31*, 1524–1529.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* *509*, 356–371.
- Hokari, R., Nagata, N., Kurihara, C., Watanabe, C., Komoto, S., Okada, Y., Kawaguchi, A., Nagao, S., Hibi, T., Nagata, K., et al. (2009). Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *The Journal of Pathology* *219*, 417–426.
- Hokari, R., Kurihara, C., Nagata, N., Aritake, K., Okada, Y., Watanabe, C., Komoto, S., Nakamura, M., Kawaguchi, A., Nagao, S., et al. (2011). Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G401-408.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugerie, L., Naim, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* *379*, 821–823.

- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 599–603.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 40096–40105.
- Iizuka, M., and Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J. Gastroenterol.* *17*, 2161–2171.
- Irikura, D., Aritake, K., Nagata, N., Maruyama, T., Shimamoto, S., and Urade, Y. (2009). Biochemical, functional, and pharmacological characterization of AT-56, an orally active and selective inhibitor of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Biol. Chem.* *284*, 7623–7630.
- Ishii, M., Asano, K., Namkoong, H., Tasaka, S., Mizoguchi, K., Asami, T., Kamata, H., Kimizuka, Y., Fujiwara, H., Funatsu, Y., et al. (2012). CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* *188*, 5655–5664.
- Iwanaga, K., Nakamura, T., Maeda, S., Aritake, K., Hori, M., Urade, Y., Ozaki, H., and Murata, T. (2014). Mast cell-derived prostaglandin D2 inhibits colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Cancer Res.* *74*, 3011–3019.
- Jamal, M.M., Adams, A.B., Jansen, J.-P., and Webster, L.R. (2015). A randomized, placebo-controlled trial of lubiprostone for opioid-induced constipation in chronic noncancer pain. *Am. J. Gastroenterol.* *110*, 725–732.
- Jarry, A., Bossard, C., Bou-Hanna, C., Masson, D., Espaze, E., Denis, M.G., and Laboisse, C.L. (2008). Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Invest.* *118*, 1132–1142.
- Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* *391*, 82–86.
- Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., and Pachnis, V. (2015). Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron* *85*, 289–295.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 321–335.
- Kapoor, M., Kojima, F., Yang, L., and Crofford, L.J. (2007). Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *76*, 103–112.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 573–621.
- Kaufmann, H.J., and Taubin, H.L. (1987). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann. Intern. Med.* *107*, 513–516.

- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., and Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 414–421.
- Kermarrec, L., Durand, T., Neunlist, M., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2016). Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J. Neuroimmunol.* 295–296, 79–83.
- Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317.
- Kim, S.C., Tonkonogy, S.L., Albright, C.A., Tsang, J., Balish, E.J., Braun, J., Huycke, M.M., and Sartor, R.B. (2005). Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 128, 891–906.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813–819.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y., and Yamamoto, M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29, 493–502.
- Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H., and Peyrin-Biroulet, L. (2016). Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.
- Kopp, Z.A., Jain, U., Van Limbergen, J., and Stadnyk, A.W. (2015). Do antimicrobial peptides and complement collaborate in the intestinal mucosa? *Front Immunol* 6, 17.
- Kostenis, E., and Ulven, T. (2006). Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends Mol Med* 12, 148–158.
- Krammer, H.J., Karahan, S.T., Sigge, W., and Kühnel, W. (1994). Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon. *Eur J Pediatr Surg* 4, 274–278.
- Kraus, S., and Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 9, 405–410.
- Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* 10 Suppl 1, S72-77.
- Lagier, J.-C., and Raoult, D. (2016). [Fecal microbiota transplantation: indications and perspectives]. *Med Sci (Paris)* 32, 991–997.
- Lampinen, M., Backman, M., Winqvist, O., Rorsman, F., Rönnblom, A., Sangfelt, P., and Carlson, M. (2008). Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1392–1399.

- Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., and Boudin, H. (2017). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J. Physiol. (Lond.)* 595, 583–598.
- Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J.F., Najib, J., Fruchart, J.C., Datz, C., Vidal, H., et al. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J. Endocrinol.* 162, 331–340.
- Lerebours, E., Savoye, G., and Guedon, C. (2003). [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 27, S76-80.
- Lesage, S., Zouali, H., Cézard, J.-P., Colombel, J.-F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C., Gassull, M., Binder, V., et al. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 845–857.
- Leslie, C.C. (2004). Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 373–376.
- Leslie, W.D., Miller, N., Rogala, L., and Bernstein, C.N. (2008). Vitamin D status and bone density in recently diagnosed inflammatory bowel disease: the Manitoba IBD Cohort Study. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1451–1459.
- Li, D.-M., Zhang, J., Li, W.-M., Cui, J.-T., Pan, Y.-M., Liu, S.-Q., Xing, R., and Lu, Y.-Y. (2013). MAWBP and MAWD inhibit proliferation and invasion in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2781–2792.
- Li, J., Kong, D., Wang, Q., Wu, W., Tang, Y., Bai, T., Guo, L., Wei, L., Zhang, Q., Yu, Y., et al. (2017). Niacin ameliorates ulcerative colitis via prostaglandin D2-mediated D prostanoid receptor 1 activation. *EMBO Mol Med* 9, 571–588.
- Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Ranger, P., and Fahmi, H. (2005). Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J. Rheumatol.* 32, 887–895.
- Lin, T.-N., Cheung, W.-M., Wu, J.-S., Chen, J.-J., Lin, H., Chen, J.-J., Liou, J.-Y., Shyue, S.-K., and Wu, K.K. (2006). 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 481–487.
- Lin, Z., Gao, N., Hu, H.-Z., Liu, S., Gao, C., Kim, G., Ren, J., Xia, Y., Peck, O.C., and Wood, J.D. (2002). Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 14, 197–204.
- Lippert, E., Gunckel, M., Brenmoehl, J., Bataille, F., Falk, W., Scholmerich, J., Obermeier, F., and Rogler, G. (2008). Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts: potential role in mucosal inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 152, 285–297.
- Loftin, C.D., Tiano, H.F., and Langenbach, R. (2002). Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 177–185.

- Lomax, A.E., Fernández, E., and Sharkey, K.A. (2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 4–15.
- Louis, E., Mary, J.-Y., Vernier-Massouille, G., Grimaud, J.-C., Bouhnik, Y., Laharie, D., Dupas, J.-L., Pillant, H., Picon, L., Veyrac, M., et al. (2012). Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology* *142*, 63-70.e5; quiz e31.
- Lovgren, A.K., Kovarova, M., and Koller, B.H. (2007). cPGES/p23 is required for glucocorticoid receptor function and embryonic growth but not prostaglandin E2 synthesis. *Mol. Cell Biol.* *27*, 4416–4430.
- Lu, P., Burger-van Paassen, N., van der Sluis, M., Witte-Bouma, J., Kerckaert, J.-P., van Goudoever, J.B., Van Seuningen, I., and Renes, I.B. (2011). Colonic gene expression patterns of mucin Muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 2047–2057.
- MacEachern, S.J., Patel, B.A., McKay, D.M., and Sharkey, K.A. (2011). Nitric oxide regulation of colonic epithelial ion transport: a novel role for enteric glia in the myenteric plexus. *J. Physiol. (Lond.)* *589*, 3333–3348.
- Mahe, M.M., Brown, N.E., Poling, H.M., and Helmrath, M.A. (2017). In Vivo Model of Small Intestine. *Methods Mol. Biol.* *1597*, 229–245.
- Mangino, M.J., Brounts, L., Harms, B., and Heise, C. (2006). Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *79*, 84–92.
- Margolis, K.G., Stevanovic, K., Karamooz, N., Li, Z.S., Ahuja, A., D'Autréaux, F., Saurman, V., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation. *Gastroenterology* *141*, 588–598, 598.e1-2.
- Martinez, C., Antolin, M., Santos, J., Torrejon, A., Casellas, F., Borrueal, N., Guarner, F., and Malagelada, J.-R. (2008). Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 643–648.
- Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., Gallego, D., Jimenez, M., and Martin, M.T. (2014). EP2 and EP4 receptors mediate PGE2 induced relaxation in murine colonic circular muscle: pharmacological characterization. *Pharmacol. Res.* *90*, 76–86.
- Martín-Venegas, R., Roig-Pérez, S., Ferrer, R., and Moreno, J.J. (2006). Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation. *J. Lipid Res.* *47*, 1416–1423.
- Masoodi, M., Pearl, D.S., Eiden, M., Shute, J.K., Brown, J.F., Calder, P.C., and Trebble, T.M. (2013). Altered colonic mucosal Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) derived lipid mediators in ulcerative colitis: new insight into relationship with disease activity and pathophysiology. *PLoS ONE* *8*, e76532.
- Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., and Oh-ishi, S. (1997). Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopoly-

saccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *230*, 110–114.

Matsuoka, T., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* *7*, 1329–1347.

McCartney, S.A., Mitchell, J.A., Fairclough, P.D., Farthing, M.J., and Warner, T.D. (1999). Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *13*, 1115–1117.

Meir, M., Flemming, S., Burkard, N., Wagner, J., Germer, C.-T., and Schlegel, N. (2016). The glial cell-line derived neurotrophic factor: a novel regulator of intestinal barrier function in health and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *310*, G1118-1123.

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*, 82–89.

Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.-A., and Neunlist, M. (2012a). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 267–273, e110.

Meurette, G., Blanchard, C., Duchalais-Dassonneville, E., Coquenlorge, S., Aubert, P., Wong, M., Lehur, P.-A., and Neunlist, M. (2012b). Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 267–273, e110.

Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Pütsep, K., and Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* *57*, 764–771.

Milatovic, D., Montine, T.J., and Aschner, M. (2011). Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *Neurotoxicology* *32*, 312–319.

Mishra, J., Waters, C.M., and Kumar, N. (2012). Molecular mechanism of interleukin-2-induced mucosal homeostasis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *302*, C735-747.

Mong, J.A., Devidze, N., Frail, D.E., O'Connor, L.T., Samuel, M., Choleris, E., Ogawa, S., and Pfaff, D.W. (2003). Estradiol differentially regulates lipocalin-type prostaglandin D synthase transcript levels in the rodent brain: Evidence from high-density oligonucleotide arrays and in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 318–323.

Montrose, D.C., Nakanishi, M., Murphy, R.C., Zarini, S., McAleer, J.P., Vella, A.T., and Rosenberg, D.W. (2015). The role of PGE2 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *116–117*, 26–36.

Moriez, R., Abdo, H., Chaumette, T., Faure, M., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: role of epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *382*, 577–582.

- Morimoto, K., Sugimoto, Y., Katsuyama, M., Oida, H., Tsuboi, K., Kishi, K., Kinoshita, Y., Negishi, M., Chiba, T., Narumiya, S., et al. (1997). Cellular localization of mRNAs for prostaglandin E receptor subtypes in mouse gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 272, G681–G687.
- Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 165–175.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.
- Mulholland, M.W., and Simeone, D.M. (1993). Prostaglandin E2 stimulation of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus neurons. *Am. J. Surg.* 166, 552–556.
- Murakami, M., and Kudo, I. (2002). Phospholipase A2. *J. Biochem.* 131, 285–292.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32783–32792.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K., and Kudo, I. (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 278, 37937–37947.
- Murakami, M., Ohta, T., Otsuguro, K.-I., and Ito, S. (2007). Involvement of prostaglandin E(2) derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 145, 642–653.
- Murakami, M., Ohta, T., and Ito, S. (2009). Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells. *J. Neurosci. Res.* 87, 2095–2104.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Sato, H., and Yamamoto, K. (2011). Secreted phospholipase A2 revisited. *J. Biochem.* 150, 233–255.
- Musquer, N., Letessier, E., Le Rhun, M., and Coron, E. (2013). Endoscopic removal of a migrating polyester band using argon plasma coagulation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 37, e89-91.
- Nagata, K., and Hirai, H. (2003). The second PGD(2) receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69, 169–177.
- Nakatani, Y., Hokonohara, Y., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kudo, I. (2007). Knockout mice lacking cPGES/p23, a constitutively expressed PGE2 synthetic enzyme, are peri-natally lethal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 387–392.
- Nalle, S.C., and Turner, J.R. (2015). Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal Immunol* 8, 720–730.

- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226.
- Neunlist, M., Frieling, T., Rupprecht, C., and Schemann, M. (1998). Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J. Physiol. (Lond.)* 506 (Pt 2), 539–550.
- Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P.A., Schemann, M., and Galmiche, J.P. (2003a). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52, 84–90.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003b). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G1028-1036.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007a). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231-241.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007b). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231-241.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. (2008). Neuro-glia cross-talk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 577–583.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 90–100.
- Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P., and De Giorgio, R. (2014a). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147, 1230–1237.
- Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P., and De Giorgio, R. (2014b). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147, 1230–1237.
- Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Tysk, C., O’Morain, C., Moum, B., Colombel, J.-F., and Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 630–649.
- Nixon, J.B., Kim, K.S., Lamb, P.W., Bottone, F.G., and Eling, T.E. (2004). 15-Lipoxygenase-1 has anti-tumorigenic effects in colorectal cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 7–15.

- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F.W.M., Tijssen, J.G.P., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* *368*, 407–415.
- Northey, A., Denis, D., Cirino, M., Metters, K.M., and Nantel, F. (2000). Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *62*, 145–156.
- Ohata, A., Usami, M., and Miyoshi, M. (2005). Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition* *21*, 838–847.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O.H., Sørensen, T.I., and Binder, V. (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *324*, 84–88.
- Owen, R.T. (2008). Lubiprostone--a novel treatment for irritable bowel syndrome with constipation. *Drugs Today* *44*, 645–652.
- Pan, W., Cheng, Y., Zhang, H., Liu, B., Mo, X., Li, T., Li, L., Cheng, X., Zhang, L., Ji, J., et al. (2014). CSBF/C10orf99, a novel potential cytokine, inhibits colon cancer cell growth through inducing G1 arrest. *Sci Rep* *4*, 6812.
- Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., et al. (2017). Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* *389*, 1218–1228.
- Park, J.M., Kanaoka, Y., Eguchi, N., Aritake, K., Grujic, S., Materi, A.M., Buslon, V.S., Tip-pin, B.L., Kwong, A.M., Salido, E., et al. (2007). Hematopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in *ApcMin/+* mice. *Cancer Res.* *67*, 881–889.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* *119*, 229–240.
- Parkes, M. (2012). Evidence from genetics for a role of autophagy and innate immunity in IBD pathogenesis. *Dig Dis* *30*, 330–333.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* *94*, 1077–1098.
- Pettipher, R. (2008). The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br. J. Pharmacol.* *153 Suppl 1*, S191-199.
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* *150*, 168–180.
- Pochard, C., Coquenlorge, S., Freyssinet, M., Naveilhan, P., Bourreille, A., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2018). The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *315*, G1–G11.

- Potten, C.S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol.* *273*, G253-257.
- Provost, M., Brégeon, J., Aubert, P., Duchalais-Dassonneville, E., D'Aldebert, E., Vergnolle, N., Neunlist, M., and Meurette, G. (2015). Effects of 1-week sacral nerve stimulation on the rectal intestinal epithelial barrier and neuromuscular transmission in a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* *27*, 40–50.
- Quénéhervé, L., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Tearney, G., and Coron, E. (2015). [Novel endoscopic techniques to image the upper gastrointestinal tract]. *Med Sci (Paris)* *31*, 777–783.
- Quénéhervé, L., David, G., Bourreille, A., Hardouin, J.B., Rahmi, G., Neunlist, N., Brégeon, J., and Coron, E. (2018). Quantitative assessment of mucosal architecture using computer-based analysis of confocal laser endomicroscopy in inflammatory bowel diseases. *Gastrointest. Endosc.*
- Quesada, S., and Jay, P. (2016). [Single cell next generation sequencing and characterization of new cell types]. *Med Sci (Paris)* *32*, 447–449.
- Radnai, B., Sturm, E.M., Stančić, A., Jandl, K., Labocha, S., Ferreirós, N., Grill, M., Hasenoehrl, C., Gorkiewicz, G., Marsche, G., et al. (2016). Eosinophils Contribute to Intestinal Inflammation via Chemoattractant Receptor-homologous Molecule Expressed on Th2 Cells, CRTH2, in Experimental Crohn's Disease. *J Crohns Colitis* *10*, 1087–1095.
- Ramasundara, M., Leach, S.T., Lemberg, D.A., and Day, A.S. (2009). Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *24*, 202–208.
- Reuter, B.K., Asfaha, S., Buret, A., Sharkey, K.A., and Wallace, J.L. (1996). Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* *98*, 2076–2085.
- Roberts, W.G., Simon, T.J., Berlin, R.G., Haggitt, R.C., Snyder, E.S., Stenson, W.F., Hanauer, S.B., Reagan, J.E., Cagliola, A., Tanaka, W.K., et al. (1997). Leukotrienes in ulcerative colitis: results of a multicenter trial of a leukotriene biosynthesis inhibitor, MK-591. *Gastroenterology* *112*, 725–732.
- Roda, G., Sartini, A., Zambon, E., Calafiore, A., Marocchi, M., Caponi, A., Belluzzi, A., and Roda, E. (2010). Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4264–4271.
- Rodríguez-Lagunas, M.J., Martín-Venegas, R., Moreno, J.J., and Ferrer, R. (2010). PGE2 promotes Ca²⁺-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *299*, C324-334.
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.-J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., and Metzger, M. (2016). Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* *11*, e0151335.
- Rossitto, M., Ujjan, S., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2015). Multiple roles of the prostaglandin D2 signaling pathway in reproduction. *Reproduction* *149*, R49-58.

- Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 777–790.
- Russel, M.G., Dorant, E., Brummer, R.J., van de Kruijs, M.A., Muris, J.W., Bergers, J.M., Goedhard, J., and Stockbrügger, R.W. (1997). Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* *113*, 377–382.
- Safdari, B.K., Sia, T.C., Wattchow, D.A., and Smid, S.D. (2016). Effects of pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharide and COX-2 mediators on human colonic neuromuscular function and epithelial permeability. *Cytokine* *83*, 231–238.
- Sandig, H., Andrew, D., Barnes, A.A., Sabroe, I., and Pease, J. (2006). 9alpha,11beta-PGF2 and its stereoisomer PGF2alpha are novel agonists of the chemoattractant receptor, CRTH2. *FEBS Lett.* *580*, 373–379.
- Sarashina, H., Tsubosaka, Y., Omori, K., Aritake, K., Nakagawa, T., Hori, M., Hirai, H., Nakamura, M., Narumiya, S., Urade, Y., et al. (2014). Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J. Immunol.* *192*, 459–465.
- Sartor, R.B. (2009). Microbial-host interactions in inflammatory bowel diseases and experimental colitis. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* *64*, 121–132; discussion 132–137, 251–257.
- Satitsri, S., Pongkorpsakol, P., Srimanote, P., Chatsudthipong, V., and Muanprasat, C. (2016). Pathophysiological mechanisms of diarrhea caused by the *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant: an in vivo study in mice. *Virulence* *7*, 789–805.
- Savidge, T.C., Sofroniew, M.V., and Neunlist, M. (2007a). Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab. Invest.* *87*, 731–736.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007b). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* *16 Suppl 1*, 55–59.
- Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H.D., Bentzel, C.J., Riecken, E.O., and Schulzke, J.D. (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* *116*, 301–309.
- Schratl, P., Royer, J.F., Kostenis, E., Ulven, T., Sturm, E.M., Waldhoer, M., Hoefler, G., Schuligoi, R., Lippe, I.T., Peskar, B.A., et al. (2007). The role of the prostaglandin D2 receptor, DP, in eosinophil trafficking. *J. Immunol.* *179*, 4792–4799.
- Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D., and Zor, U. (1978). Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* *75*, 638–640.
- Shaw, S.Y., Blanchard, J.F., and Bernstein, C.N. (2010). Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 2687–2692.

- Smith, W.L., Rieke, C.J., Thuresson, E.D., Mulichak, A.M., and Garavito, R.M. (2000). Fatty-acid substrate interactions with cyclo-oxygenases. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 53–64.
- Smith, W.L., Urade, Y., and Jakobsson, P.-J. (2011). Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem. Rev.* 111, 5821–5865.
- Smyth, C.M., Akasheh, N., Woods, S., Kay, E., Morgan, R.K., Thornton, M.A., O’Grady, A., Cummins, R., Sheils, O., Smyth, P., et al. (2013). Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 8, e64216.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 249–263.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., et al. (2008a). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16731–16736.
- Sokol, H., Lay, C., Seksik, P., and Tannock, G.W. (2008b). Analysis of bacterial bowel communities of IBD patients: what has it revealed? *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 858–867.
- Soret, R., Coquenlorge, S., Cossais, F., Meurette, G., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. (2013). Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, e755-764.
- Spiegelman, B.M. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47, 507–514.
- Stedman, A., Nigro, G., and Sansonetti, P.J. (2016). [Microbiota-intestinal stem cells dialog: a key element for intestinal regeneration]. *Med Sci (Paris)* 32, 983–990.
- Steinkamp, M., Gundel, H., Schulte, N., Spaniol, U., Pflueger, C., Zizer, E., and von Boyen, G.B.T. (2012a). GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol* 12, 6.
- Steinkamp, M., Schulte, N., Spaniol, U., Pflüger, C., Hartmann, C., Kirsch, J., and von Boyen, G.B. (2012b). Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med. Sci. Monit.* 18, BR117-122.
- Stenson, W.F. (2014). The universe of arachidonic acid metabolites in inflammatory bowel disease: can we tell the good from the bad? *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30, 347–351.
- Stoffels, B., Hupa, K.J., Snoek, S.A., van Bree, S., Stein, K., Schwandt, T., Vilz, T.O., Lysson, M., Veer, C.V., Kummer, M.P., et al. (2014). Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* 146, 176-187.e1.
- Straus, D.S., and Glass, C.K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 21, 185–210.

- Straus, D.S., Pascual, G., Li, M., Welch, J.S., Ricote, M., Hsiang, C.H., Sengchanthalangsy, L.L., Ghosh, G., and Glass, C.K. (2000). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 4844–4849.
- Strober, W., Fuss, I., and Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* *117*, 514–521.
- Strober, W., Asano, N., Fuss, I., Kitani, A., and Watanabe, T. (2014). Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. *Immunol. Rev.* *260*, 249–260.
- Sturm, E.M., Radnai, B., Jandl, K., Stančić, A., Parzmair, G.P., Högenauer, C., Kump, P., Wenzl, H., Petritsch, W., Pieber, T.R., et al. (2014). Opposing roles of prostaglandin D2 receptors in ulcerative colitis. *J. Immunol.* *193*, 827–839.
- Sugimoto, Y., and Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E Receptors. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 11613–11617.
- Suply, E., de Vries, P., Soret, R., Cossais, F., and Neunlist, M. (2012). Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G1373–1380.
- Takafuji, V., Cosme, R., Lublin, D., Lynch, K., and Roche, J.K. (2000). Prostanoid receptors in intestinal epithelium: selective expression, function, and change with inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *63*, 223–235.
- Takafuji, V.A., Evans, A., Lynch, K.R., and Roche, J.K. (2002). PGE(2) receptors and synthesis in human gastric mucosa: perturbation in cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *66*, 71–81.
- Takeuchi, K., Koyama, M., Hayashi, S., and Aihara, E. (2010a). Prostaglandin EP receptor subtypes involved in regulating HCO₃⁽⁻⁾ secretion from gastroduodenal mucosa. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 1241–1251.
- Takeuchi, K., Kato, S., and Amagase, K. (2010b). Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J. Pharmacol. Sci.* *114*, 248–261.
- Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *68–69*, 95–114.
- Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., and Nagata, K. (2000). Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J. Immunol.* *164*, 2277–2280.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., and Watanabe, K. (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291*, 884–889.

- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *275*, 32775–32782.
- Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 721–732.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *118*, 331–340.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.* *15*, 239–242.
- Toumi, F., Neunlist, M., Denis, M.G., Oreshkova, T., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2004). Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *317*, 187–191.
- Townley, R.G., and Agrawal, S. (2012). CRTH2 antagonists in the treatment of allergic responses involving TH2 cells, basophils, and eosinophils. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *109*, 365–374.
- Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.-M., Saha, S., Roach, M.L., et al. (2003). Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 9044–9049.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 285–293.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* *11*, 433–439.
- Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., and Cuomo, R. (2014). Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* *63*, 105–115.
- Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., and Flodérus-Myrhed, B. (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* *29*, 990–996.
- Tytgat, K.M., van der Wal, J.W., Einerhand, A.W., Büller, H.A., and Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 397–405.
- Ueno, N., Takegoshi, Y., Kamei, D., Kudo, I., and Murakami, M. (2005). Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 70–76.

- Urade, Y. (1985). [Prostaglandin D synthetase and brain]. *Seikagaku* 57, 1624–1629.
- Urade, Y., and Eguchi, N. (2002). Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 375–382.
- Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 259–271.
- Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20858–20863.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G976–987.
- Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Tonini, M., De Ponti, F., and De Giorgio, R. (2006). Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 126–127, 264–272.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726–1729.
- Vergnolle, N., and Cirillo, C. (2018). Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function. *Physiology (Bethesda)* 33, 269–280.
- Vesin, M.F., Billotte, C., and Droz, B. (1995a). Biosynthesis of prostaglandin D2 by motoneurons and dorsal horn microneurons: a biochemical and high resolution immunocytochemical study in chick spinal cord. *Neuroscience* 69, 967–975.
- Vesin, M.F., Urade, Y., Hayaishi, O., and Droz, B. (1995b). Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 15, 470–476.
- Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., Salerni, B., and Geboes, K. (2008). Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 1009–1016.
- Vong, L., Ferraz, J.G.P., Panaccione, R., Beck, P.L., and Wallace, J.L. (2010). A pro-resolution mediator, prostaglandin D2, is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12023–12027.
- Wallace, J.L. (1992). Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 21, 631–641.
- Wallace, J.L. (2001). Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 30, 971–980.

- Wallace, J.L. (2018). Eicosanoids in the gastrointestinal tract: Eicosanoids in the GI tract. *British Journal of Pharmacology*.
- Wallace, J.L., McKnight, W., Reuter, B.K., and Vergnolle, N. (2000). NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* *119*, 706–714.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2006). Prostaglandins and cancer. *Gut* *55*, 115–122.
- Wang, D., Mann, J.R., and DuBois, R.N. (2005a). The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* *128*, 1445–1461.
- Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R. (2005b). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am. J. Pathol.* *166*, 409–419.
- Wang, M., Ahrné, S., Jeppsson, B., and Molin, G. (2005c). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* *54*, 219–231.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Z., Pan, L., and Zhang, Y. (2014). Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother* *10*, 3544–3551.
- Wang, S., Dong, Y., Zhang, Y., Wang, X., Xu, L., Yang, S., Li, X., Dong, H., Xu, L., Su, L., et al. (2015). DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/ β -catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene* *34*, 2575–2585.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H.P., Kühnel, W., and Krammer, H.J. (1999). Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann. Anat.* *181*, 327–337.
- Weimers, P., and Munkholm, P. (2018). The Natural History of IBD: Lessons Learned. Current Treatment Options in Gastroenterology *16*, 101–111.
- Wells, J.M., Brummer, R.J., Derrien, M., MacDonald, T.T., Troost, F., Cani, P.D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W.M., et al. (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *312*, G171–G193.
- West, C.E., Renz, H., Jenmalm, M.C., Kozyrskyj, A.L., Allen, K.J., Vuillermin, P., Prescott, S.L., and in-FLAME Microbiome Interest Group (2015). The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies. *J. Allergy Clin. Immunol.* *135*, 3–13; quiz 14.
- Wiercinska-Drapalo, A., Flisiak, R., and Prokopowicz, D. (1999). Mucosal and plasma prostaglandin E2 in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* *46*, 2338–2342.
- Willemsen, L.E.M., Koetsier, M.A., van Deventer, S.J.H., and van Tol, E. a. F. (2003). Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* *52*, 1442–1447.

Willis, C.L., Leach, L., Clarke, G.J., Nolan, C.C., and Ray, D.E. (2004). Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia* 48, 1–13.

Wlodarska, M., Kostic, A.D., and Xavier, R.J. (2015). An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 17, 577–591.

Wood, J.D. (1999). Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system. *Chin J Physiol* 42, 201–210.

Wright, D.H., Ford-Hutchinson, A.W., Chadee, K., and Metters, K.M. (2000). The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1537–1545.

Xue, L., Gyles, S.L., Wetthey, F.R., Gazi, L., Townsend, E., Hunter, M.G., and Pettipher, R. (2005). Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *J. Immunol.* 175, 6531–6536.

Yagami, T., Koma, H., and Yamamoto, Y. (2016). Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol. Neurobiol.* 53, 4754–4771.

Yang, W., Rachez, C., and Freedman, L.P. (2000). Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8008–8017.

Yu, Y., and Chadee, K. (1998). Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* 161, 3746–3752.

Yu, Y.-B., and Li, Y.-Q. (2014). Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J. Gastroenterol.* 20, 11273–11280.

Zamuner, S.R., Warriar, N., Buret, A.G., MacNaughton, W.K., and Wallace, J.L. (2003). Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut* 52, 1714–1720.

Zamuner, S.R., Bak, A.W., Devchand, P.R., and Wallace, J.L. (2005). Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am. J. Pathol.* 167, 1293–1300.

Zayed, N., Li, X., Chabane, N., Benderdour, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Duval, N., and Fahmi, H. (2008). Increased expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 10, R146.

Zhang, D.K., He, F.Q., Li, T.K., Pang, X.H., Cui, D.J., Xie, Q., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol.* 222, 213–222.

Zhao, J., Zhao, R., Cheng, L., Yang, J., and Zhu, L. (2018). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes intestinal barrier function by improving mucus and tight junctions in a mouse colitis model. *Dig Liver Dis.*

Bibliographie

Annexe 1 : revue médecine sciences



médecine/sciences 2015 ; 31 : 617-21

► La prostaglandine D2 (PGD2) et ses dérivés sont des médiateurs lipidiques participant à l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. Leur implication dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin reste encore débattue. Plusieurs résultats soulignent la dualité de la PGD2 quant à son rôle anti- ou pro-inflammatoire. Cette dualité semble liée à une expression différentielle de ses récepteurs par les cellules épithéliales intestinales et par les cellules immunocompétentes environnantes. Les cellules gliales du système nerveux entérique sont capables de sécréter ces médiateurs. Le rôle protecteur du système nerveux entérique dans le contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale a été démontré. Ainsi, la PGD2 et ses dérivés se révèlent être de nouveaux acteurs de l'unité neuro-glio-épithéliale impliqués dans la régulation des fonctions des cellules épithéliales intestinales. ◀



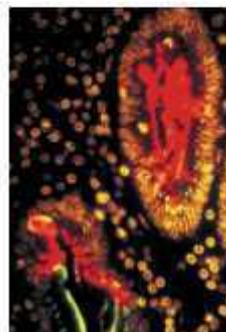
L'implication des prostaglandines (PG) dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) a été évoquée dès 1977 [1]. Selon les études et en fonction des médiateurs concernés, les rôles de ces molécules peuvent être protecteurs ou délétères. Ainsi, la prostaglandine E2 (PGE2), issue de la voie des cyclo-oxygénases (COX), est classiquement décrite comme pro-inflammatoire et constitue le principal produit de cette voie métabolique présent sur le site de l'inflammation [2]. Dès 1978, des concentrations importantes de PGE2 ont été observées dans la muqueuse inflammatoire de patients atteints de rectocolite hémorragique, corrélées à la sévérité de la maladie [3]. L'impact délétère de cette production de PGE2 sur la barrière épithéliale intestinale a été en grande partie décrypté. Il est lié à l'activation des récepteurs EP1 et EP4 (*E-prostanoid (EP) receptors 1 et 4*)¹ de la PGE2,

¹ La famille des récepteurs de la PGE2 (*E-prostanoid (EP) receptors*) est subdivisée en 4 types : EP1 à EP4.

Prostaglandine D2 et homéostasie de la barrière épithéliale intestinale

Une relation équivoque

Anne-Gaëlle Le Loupp^{1,2}, Kalyane Bach-Ngohou^{1,2}, Armel Bettan¹, Marc Denis^{1,2}, Damien Masson^{1,2}



¹ Inserm UMR913, institut des maladies de l'appareil digestif, Université de Nantes, CHU Hôtel-Dieu, 3, place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France ;

² Laboratoire de Biochimie, institut de biologie, CHU Nantes, 9, quai Moncoussu, 44093 Nantes, France.

damien.masson@chu-nantes.fr

qui entraîne une rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale [4]. À l'inverse de la PGE2, la prostaglandine D2 (PGD2), également issue de la voie des COX, serait plutôt anti-inflammatoire. Néanmoins, son rôle dans le contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale n'est que partiellement élucidé. Les données de la littérature suggèrent qu'au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la production de PGD2 est plus tardive que celle de PGE2, mais qu'elle serait persistante et contemporaine de la résolution de certains processus inflammatoires [5-7]. Deux études récentes portant sur des patients atteints de rectocolite hémorragique montrent l'implication de ce médiateur lipidique dans la physiopathologie de ces maladies inflammatoires [6, 8].

Une voie métabolique unique pour de multiples médiateurs lipidiques

La PGD2 est un prostanoloïde issu du métabolisme de l'acide arachidonique (AA), sous l'action couplée d'une cyclooxygénase (COX) et d'une prostaglandine D synthase (PGDS) (Figure 1) [9, 10]. De nature instable, la PGD2 subit rapidement une déshydratation chimique non enzymatique, et se transforme en divers métabolites dont la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-PGJ2). Cette dernière joue un rôle sur la barrière épithéliale intestinale, notamment via son récepteur nucléaire PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor*). Ainsi, à partir d'un même précurseur, une voie métabolique identique permet d'aboutir à des composés lipidiques différents, dont les effets peuvent être multiples.



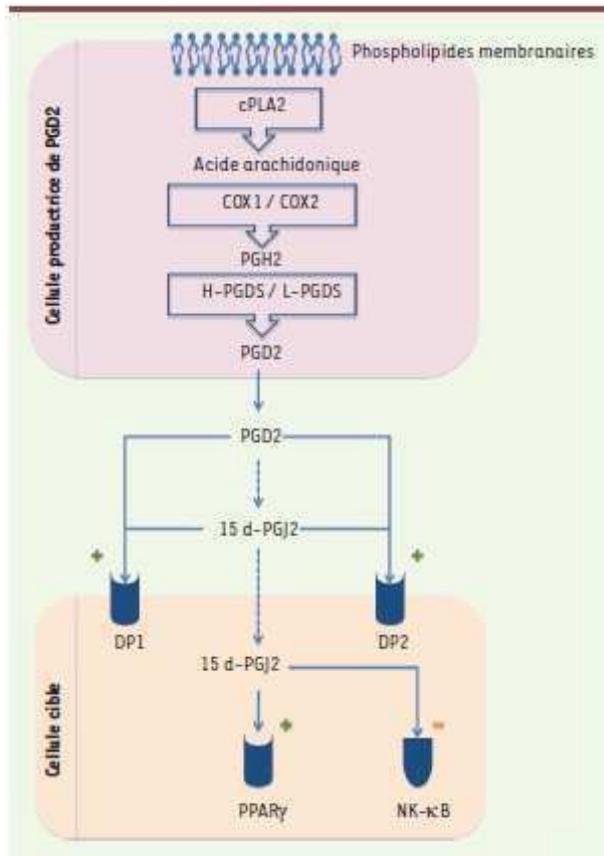


Figure 1. Voie métabolique de synthèse de la PGD2 et de la 15d-PGJ2.

Sous l'action de la phospholipase A2 (cPLA2), l'AA est libéré par hydrolyse des phospholipides membranaires. Il est transformé en PGD2 grâce au couplage fonctionnel d'une COX à une PGDS. Une COX catalyse la réaction de bisoxygénation et d'hydroperoxydation de l'AA en prostaglandine G2 (PGG2), suivie d'une réduction en prostaglandine H2 (PGH2). La PGD2 est issue de l'isomérisation de la PGH2 par une PGDS. Deux cyclo-oxygénases sont décrites, COX1 et COX2 : alors que COX1 est exprimée de manière constitutive dans tous les tissus, COX2 est induite par de nombreux facteurs de croissance ou stimulus pro-inflammatoires. Ceux-ci induisent une redistribution généralement périnucléaire de COX2. C'est cette mobilité dynamique qui, en juxtaposant cPLA2, COX2 et les PG synthases, favorise l'induction de la synthèse des PG. Il existe également deux types de prostaglandine D synthase, différant par leur localisation tissulaire et leur fonctionnalité. La lipocaline-PGDS (LPGDS), indépendante du glutathion, a été initialement identifiée au niveau du système nerveux central [11]. Sa fonction est double : isomérase pour la transformation de la PGH2 en PGD2, et transporteur lipidique. En effet, la LPGDS est une glycoprotéine sécrétée dans les espaces extracellulaires qui a la capacité de lier et de transporter de petites molécules lipophiles. La PGDS hématopoïétique

(HPGDS) est, quant à elle, dépendante du glutathion, constitutive et de localisation cytosolique. Elle est décrite comme l'enzyme clé de la synthèse de la PGD2 par les cellules du système immunitaire et les mastocytes [12]. Au niveau intestinal, la HPGDS est principalement exprimée par les cellules épithéliales intestinales, les mastocytes et les fibroblastes [13-15]. L'expression de la LPGDS est plus restreinte, mais elle est induite en situation inflammatoire [8, 15]. Cette prostaglandine D synthase est préférentiellement exprimée par les cellules gliales du système nerveux entérique, en particulier au sein des ganglions des plexus sous muqueux et myentériques [15].

Les effets biologiques de la PGD2 sont relayés par l'activation de deux récepteurs à sept domaines transmembranaires : DP1 et DP2 (ou CRTH2, *chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on the Th2 cells*) (Figure 1). L'activation de DP1 couplé à la protéine Gs conduit à la production d'AMPc qui induit la voie de la protéine kinase A ainsi qu'un flux calcique entrant [16]. DP1 est impliqué dans la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative [17], notamment via la réduction de l'infiltration leucocytaire et le contrôle de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires [18]. À l'inverse, l'activation de DP2 couplé à la protéine Gi inhibe la production d'AMPc et induit une mobilisation intracellulaire de calcium [19]. DP2 est décrit en particulier pour son implication dans la promotion de la réaction allergique, le contrôle du recrutement de polynucléaires neutrophiles au niveau d'un site infectieux et de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires [20]. La 15d-PGJ2, par l'intermédiaire de PPARγ, est impliquée dans le contrôle de la réponse inflammatoire et des processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales intestinales (Figure 2) [15, 21].

Dualité de la PGD2 dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

L'implication de la PGD2 dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est actuellement débattue. Plusieurs arguments forts sont en faveur d'un impact bénéfique de la PGD2 lorsqu'elle interagit avec son récepteur DP1. Un modèle expérimental de colite chez le rat démontre que la PGD2 induit une diminution de l'infiltrat granulocytaire dans la muqueuse colique. Cet effet est également observé lors de l'administration d'un agoniste de DP1, suggérant l'implication de ce dernier [5]. Une étude basée sur l'analyse de biopsies coliques de patients présentant une rectocolite hémorragique montre l'implication de la PGD2 et de ce même récepteur DP1 dans la résolution du processus inflammatoire et la persistance des rémissions au cours

de cette maladie. En effet, une surexpression de DP1 associée à une augmentation de la production de PGD2 est observée chez les patients en rémission par rapport aux patients en phase active de la maladie [6]. À l'inverse, un effet délétère de la PGD2 a été évoqué dans un modèle de colite induite par instillation d'acide trinitrobenzène sulfonique [22]. D'autres travaux évoquent l'implication de la voie COX/LPGDS dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'étude d'Hokari et al., réalisée également sur des biopsies de patients présentant une rectocolite hémorragique, montre une augmentation de l'expression de la LPGDS, corrélée à la sévérité de la maladie [8]. Le phénotype des animaux chez lesquels une invalidation du gène codant pour la LPGDS a été réalisée ajoutée à la complexité du rôle joué par la PGD2 dans le contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. Ainsi, chez les souris *lpgds*^{-/-} traitées par du dextran sulfate de sodium, l'atteinte inflammatoire est moins importante que celle observée chez des souris témoins également traitées par le dextran sulfate de sodium [7]. L'ensemble de ces données souligne toute la complexité du rôle de la PGD2 dans le contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale et dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. La dualité des effets observés repose probablement sur les différentes voies de signalisation activées par la PGD2 et la 15d-PGJ2, ainsi que sur la régulation de l'expression des récepteurs de ces molécules en situation inflammatoire. L'étude récente de Sturm et al. renforce cette hypothèse. Dans un modèle de colite induite chez le rat, les auteurs décrivent un rôle anti-inflammatoire de la PGD2 lorsqu'elle interagit avec DP1 et, à l'inverse, un rôle pro-inflammatoire quand elle se lie à DP2. Ils observent également une expression différentielle de DP1 et DP2 sur les leucocytes du sang périphérique de patients présentant une rectocolite hémorragique active par rapport aux leucocytes de sujets contrôles [23]. Les aspects mécanistiques ne sont pas encore décryptés ; en effet, les principales lignées cellulaires épithéliales utilisées dans les études, dérivées d'adénocarcinome colorectal, n'expriment ni DP1 ni DP2 [24], et, à l'heure actuelle, aucune étude du rôle de la PGD2 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin n'a été conduite sur des lignées de cellules épithéliales intestinales. L'action anti-inflammatoire de la PGD2 est en partie attribuée à son produit de déshydratation, la 15d-PGJ2. Ce dernier est un ligand naturel de PPAR γ , dont l'activation conduit à une inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunocompétentes [25], à l'arrêt de la prolifération et à l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Figure 2) [16]. PPAR γ est un acteur essentiel du maintien de l'immunité innée antimicrobienne au niveau du côlon [26]. De plus, il est clairement établi que la 15d-PGJ2 réprime l'activation de NF- κ B en inhibant la phosphorylation de κ B par la kinase I κ BK (Figure 1) [27, 28]. Enfin, une diminution de l'expression de PPAR γ est observée en phase active de rectocolite hémorragique [29]. Un défaut d'expression de la voie de signalisation anti-inflammatoire PPAR γ pourrait donc être l'un des éléments de la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

En ce qui concerne DP1, une voie de signalisation spécifique impliquée dans l'induction de l'expression de la mucine MUC5B a été décrite [30]. Une augmentation de l'expression des mucines MUC2 et MUC5A,

via DP1, a également été mise en évidence sur la lignée de cellules épithéliales intestinales LS174T, à caractère mucosécrétoire (Figure 2) [31]. Comme la fonction principale des mucines est de former un gel de mucus qui protège la muqueuse colique [28], le rôle bénéfique de la PGD2 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin pourrait être lié à l'augmentation de la sécrétion des mucines après activation de DP1. Les mucines MUC5A et MUC2 sont en effet impliquées dans la réparation épithéliale au cours de ces maladies, via leur action sur la différenciation et la croissance cellulaire [32-34].

Il est nécessaire de distinguer les effets directs de la PGD2 sur les cellules épithéliales intestinales par l'activation de ses récepteurs, des effets qu'elle exerce sur les cellules immunocompétentes environnantes, en particulier sur la régulation de leur recrutement. Dans un modèle de colite induite chez le rat par instillation d'acide trinitrobenzène sulfonique, l'administration de PGD2 inhibe l'infiltration des cellules granuleuses au niveau de la muqueuse, potentiellement par l'intermédiaire de son récepteur DP1, alors que l'administration d'un inhibiteur de cyclo-oxygénases induit cet infiltrat [5]. La participation de DP2 au recrutement des polynucléaires neutrophiles est également suggérée dans un modèle murin de sepsis sévère obtenu après ligature et perforation du cæcum [19]. Dans ce modèle, l'absence de DP2 (invalidation génique) est associée à une suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires, à l'induction de la production d'interleukine (IL)-10 et à une augmentation du recrutement au niveau péritonéal des neutrophiles, via le récepteur de chimiokines CXCR2, dont l'activation induit la migration et l'activation de ces polynucléaires (Figure 2).

Action paracrine de la PGD2 au sein de l'unité neuro-glio-épithéliale

Plusieurs données permettent d'identifier l'origine de la PGD2 au niveau de la muqueuse intestinale. Le système nerveux entérique, composé de cellules gliales entériques et de neurones, s'intègre avec la barrière épithéliale intestinale au sein d'une unité fonctionnelle, appelée unité neuro-glio-épithéliale. Le fonctionnement de cette unité repose sur la proximité physique de ses différents composants [35]. De la même façon que les astrocytes du système nerveux central contrôlent la barrière hémato-encéphalique, les cellules gliales entériques sont des régulateurs majeurs des fonctions de la barrière épithéliale intestinale [36]. Ce contrôle est assuré par des médiateurs neuro-gliaux comme le TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*), le facteur VIP (*vasoactive intestinal*



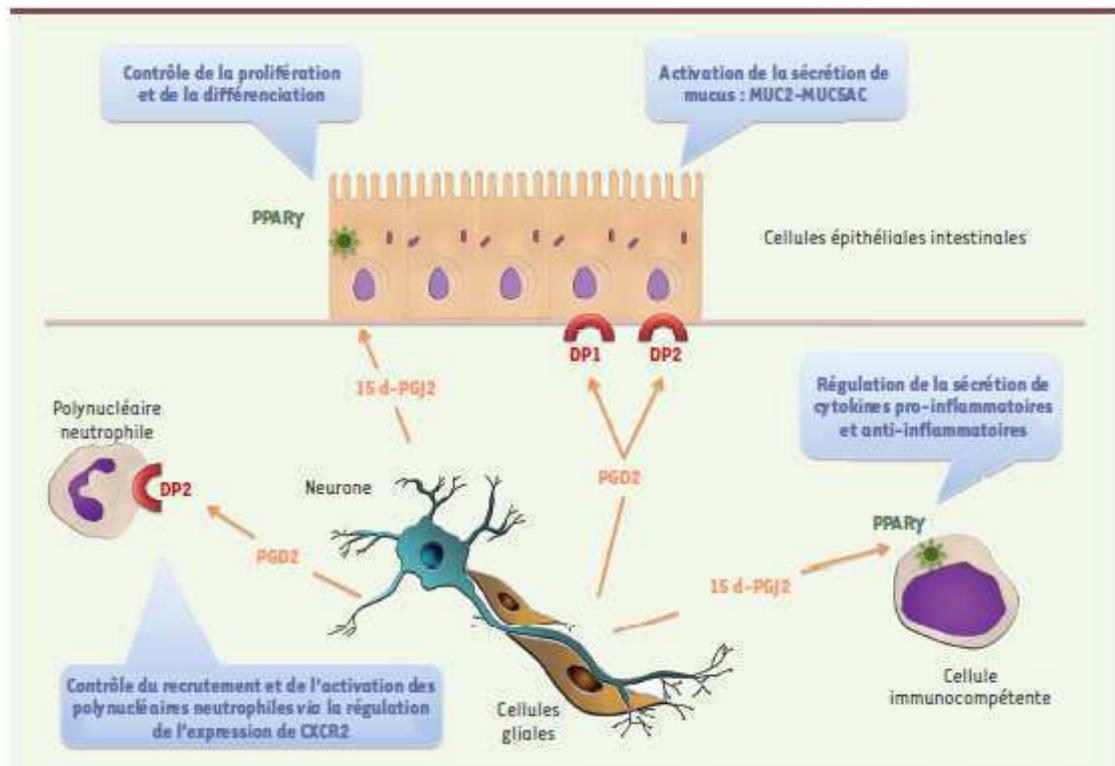


Figure 2. Schéma de synthèse du contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale par la PGD2 et la 15d-PGJ2 sécrétées par les cellules gliales et les neurones du système nerveux entérique.

peptide) ou encore le GSNO (glutathion nitrosylé) [36-39]. La PGD2 semble également participer à cette relation glio-épithéliale. En effet, l'expression de la LPGDS par les cellules gliales du système nerveux entérique d'une part, et la modulation des mécanismes de réparation et de différenciation des cellules épithéliales intestinales par la 15d-PGJ2 d'autre part, confortent l'hypothèse selon laquelle le système nerveux entérique est à l'origine d'une production locale de PGD2 et de 15d-PGJ2 régulant les fonctions des cellules épithéliales intestinales (Figure 2) [15].

Ces données sont en accord avec le rôle joué par le système nerveux entérique dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Initialement considéré comme une cible de l'inflammation, du fait de l'observation de nombreuses lésions et modifications morphologiques, neurochimiques et fonctionnelles [40], le système nerveux entérique apparaît aujourd'hui comme un acteur essentiel du processus inflammatoire. En effet, les cellules gliales entériques expriment la machinerie cellulaire nécessaire à l'intégration d'un signal inflammatoire ayant pour origine les *Toll-like receptors* [41]. En réponse à ce signal, elles sont capables de proliférer et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-1β [36, 42], ou encore des prostanoides issus de la voie métabolique COX-LPGDS [15, 43].

En conclusion, de nombreux et récents travaux démontrent que la PGD2 et la 15d-PGJ2 jouent un rôle essentiel dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. Les cellules gliales du système nerveux entérique expriment les récepteurs et les enzymes indispensables à l'intégration d'un signal inflammatoire, ainsi qu'à l'établissement d'une relation paracrine avec les cellules épithéliales intestinales, notamment par la sécrétion des médiateurs lipidiques que sont la PGD2 et son dérivé, la 15d-PGJ2. Le rôle joué par ces médiateurs sur la barrière épithéliale intestinale reste complexe, en particulier en condition inflammatoire. Il fait intervenir une régulation de l'immunité innée et une régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. ◊

SUMMARY

Dual role for prostaglandin D2 in intestinal epithelial homeostasis

Prostaglandin D2 (PGD2) and derivatives are lipid mediators involved in the control of the intestinal epithelial barrier homeostasis. Their involvement in the pathology-

biology of chronic inflammatory bowel disease (IBD) is still debated. Several results highlight the duality of PGD2 as an anti- or pro-inflammatory mediator. This duality seems to be related to a differential expression of its receptors by intestinal epithelial cells and the surrounding immunocompetent cells. The enteric glial cells from the enteric nervous system (ENS) express the lipocalin-type-prostaglandin D synthase and secrete PGD2 and 15d-PGJ2. The protective role of the ENS in the homeostatic control of the epithelial intestinal barrier and its involvement in the pathogenesis of IBD have already been demonstrated. Thus, these lipid mediators seem to be new actors of the neuro-glia-epithelial unit and could play a crucial role maintaining gut barrier integrity. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

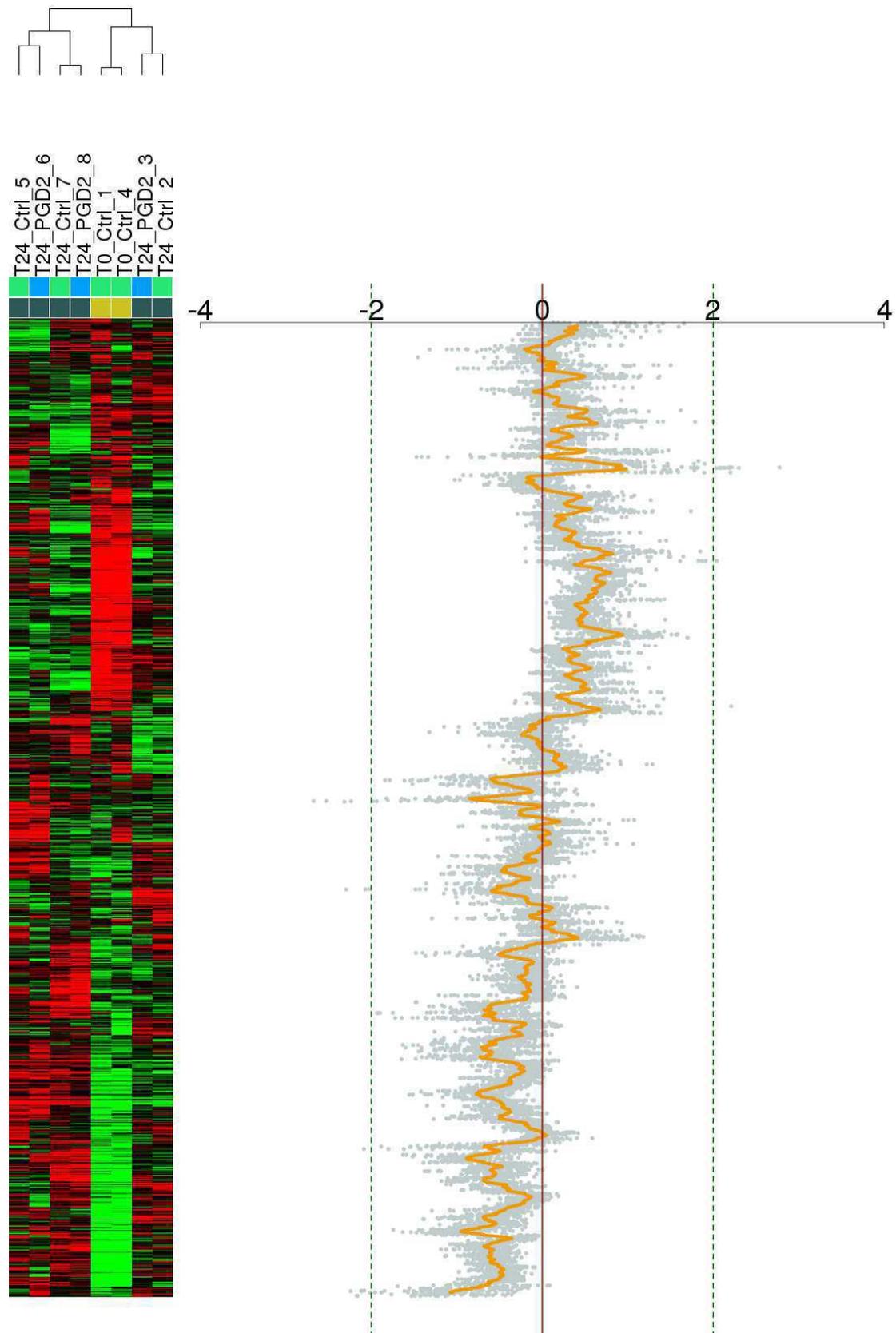
RÉFÉRENCES

- Gould SR, Brash AR, Conolly ME. Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet* 1977; 2: 98.
- Murokami M, Naraba H, Tanioka T, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 32783-92.
- Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, Zor U. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1978; 75: 638-40.
- Rodríguez-Lagunas MJ, Martín-Venegas R, Moreno JJ, Ferrer R. PGE2 promotes Ca2+-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C324-34.
- Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 279: G238-44.
- Vong L, Ferraz JG, Panaccione R, et al. A pro-resolution mediator, prostaglandin D(2), is specifically up-regulated in individuals in long-term remission from ulcerative colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 12023-7.
- Zamaner SR, Bek AW, DeWichand PR, Wallace JL. Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am J Pathol* 2005; 167: 1293-300.
- Hokari R, Kurihara C, Nagata N, et al. Increased expression of lipocalin-type-prostaglandin D synthase in ulcerative colitis and exacerbating role in murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G401-8.
- Smith WL, Urade Y, Jakubsson PI. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 2011; 111: 5821-65.
- Malki S, Declosmenil F, Farhat A, et al. La prostaglandine D2 - Nouveaux rôles dans la genèse embryonnaire et pathologique. *Med Sci (Paris)* 2008; 24: 177-83.
- Urade Y, Fujimoto N, Hayashi O. Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthase. *J Biol Chem* 1985; 260: 12419-5.
- Kanaoka Y, Fujimori K, Kikuno R, et al. Structure and chromosomal localization of human and mouse genes for hematopoietic prostaglandin D synthase. Conservation of the ancestral genomic structure of sigma-class glutathione S-transferase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3315-22.
- Hokari R, Nagata N, Kurihara C, et al. Increased expression and cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *J Pathol* 2009; 219: 417-26.
- Park JM, Kanaoka Y, Epuchi N, et al. Hemopoietic prostaglandin D synthase suppresses intestinal adenomas in Apc(Min)/+ mice. *Cancer Res* 2007; 67: 883-9.
- Bach-Ngohou K, Mahe MM, Aubert P, et al. Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol* 2010; 588: 2533-44.
- Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, et al. Molecular cloning and characterization of the human prostanoil DP receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 18910-6.
- Hammad H, Kool M, Soullie T, et al. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J Exp Med* 2007; 204: 357-67.
- Rajakumar R, Hillard M, Lawrence T, et al. Hemopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxy-Delta12,14-PGJ2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20979-84.
- Ishii M, Asano K, Naimkoong H, et al. CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2012; 188: 5655-64.
- Sato T, Mori R, Aritake K, et al. Prostaglandin D2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J Immunol* 2006; 177: 2621-9.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82.
- Zamaner SR, Marier N, Baret AG, et al. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. *Gut* 2003; 52: 1714-20.
- Sturm EM, Radnal B, Jandl K, et al. Opposing roles of prostaglandin D2 receptors in ulcerative colitis. *J Immunol* 2014; 193: 827-39.
- Hawcroft G, Gardner SH, Hull MA. Expression of prostaglandin D2 receptors DP1 and DP2 by human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 2004; 210: 81-4.
- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-6.
- Peyrin-Biroulet L, Belaner J, Wang G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 8772-7.
- Castillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortalano S, et al. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 1692-8.
- Hanson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 57-62.
- Dubuquoy L, Jansson SA, Deeb S, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1265-76.
- Choi YH, Lee SN, Aoyagi H, et al. The intracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 protein kinase 1 cascade phosphorylates cAMP response element-binding protein to induce MUC5B gene expression via D-prostanoid receptor signaling. *J Biol Chem* 2011; 286: 24199-214.
- Wright DH, Ford-Hutchinson AW, Chadee K, Metters KM. The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 1537-45.
- Valcich A, Yang W, Hayer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002; 295: 1726-9.
- Buisson MP, Desreumaux P, Letourbe E, et al. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 544-51.
- Zouitan-Melki L, Serghini M, Fekih M, et al. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 2013; 29: 1145-50.
- Neurist M, Van Landeghem L, Bourvella A, Savidge T. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 577-83.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of 5-nitroglutathione. *Gastroenterology* 2007; 132: 1344-58.
- Neurist M, Van Landeghem L, Mahe MM, et al. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 7: 90-100.
- Neurist M, Toumi F, Dnaschlova T, et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G3028-36.
- Neurist M, Aubert P, Bonnaud S, et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G231-41.
- Villanacci V, Bassotti G, Nascimben R, et al. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1009-16.
- Barajon I, Serrao E, Annaboldi F, et al. Toll-like receptors T, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 1013-23.
- Rühl A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 777-90.
- Masriier JF, Jarry A, Comdesseanche JP, Antoine IC, Laboisse CL. In situ evidence of involvement of Schwann cells in ulcerative colitis: autocrine and paracrine signaling by A disintegrin and metalloprotease-17-mediated tumor necrosis factor alpha production. *Hum Pathol* 2009; 40: 1158-67.

TIRÉS À PART
D. Masson

Annexes

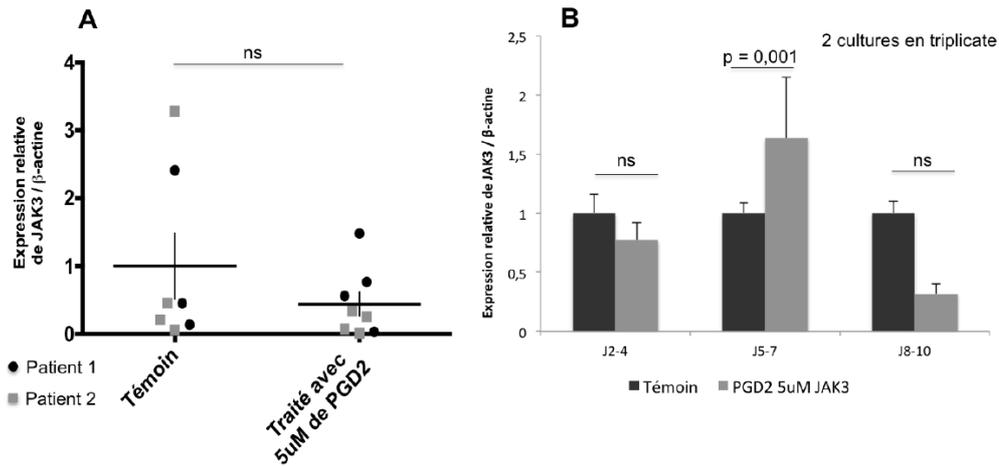
Annexe 2 : Clustering de l'analyse transcriptomique



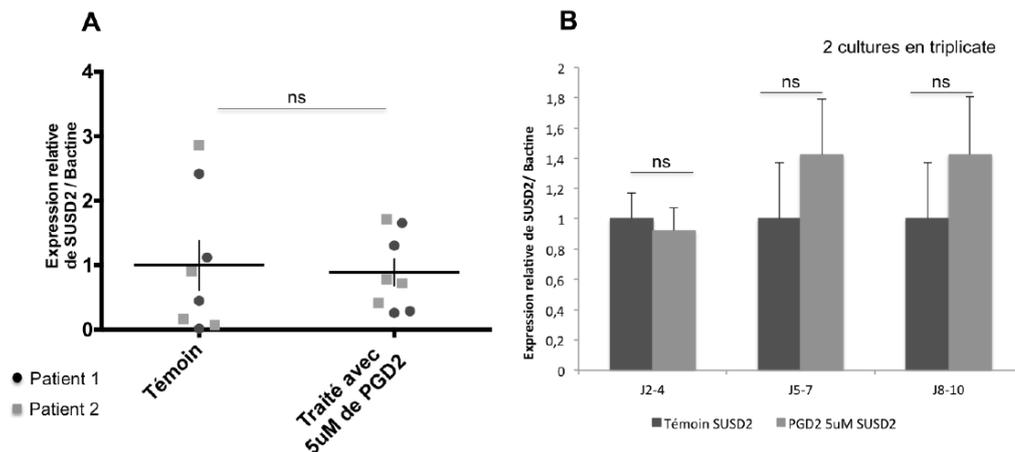
Annexe 3 : Analyse transcriptionnelle des 7 gènes d'intérêts

(A) Dans des explants de muqueuses coliques humaines normales traités ou non pendant 24h avec 5 μ M de PGD2 de deux patients. (B) Dans une des cellules LS174T traitées avec deux doses à 24h d'intervalles de 5 μ M de PGD2 et récupérées dans un tampon de lyse à J4, J7, et J10.

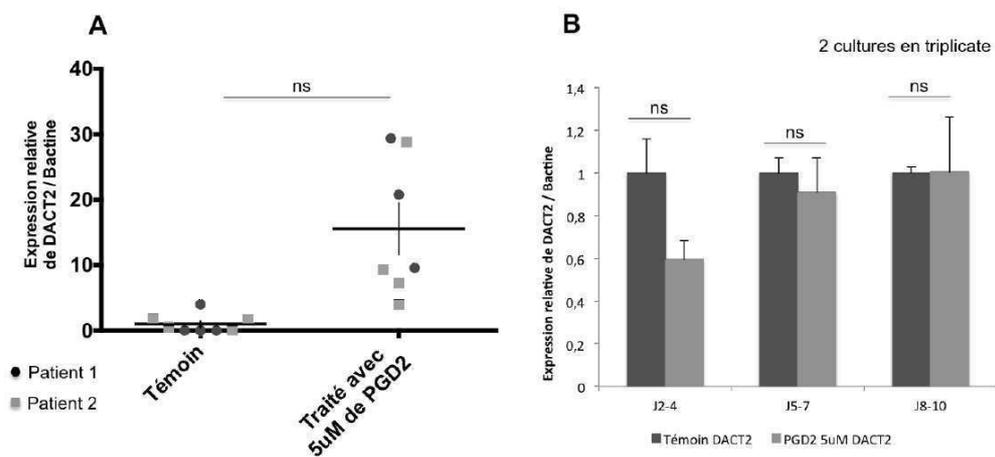
Analyse transcriptionnelle du gène JAK3



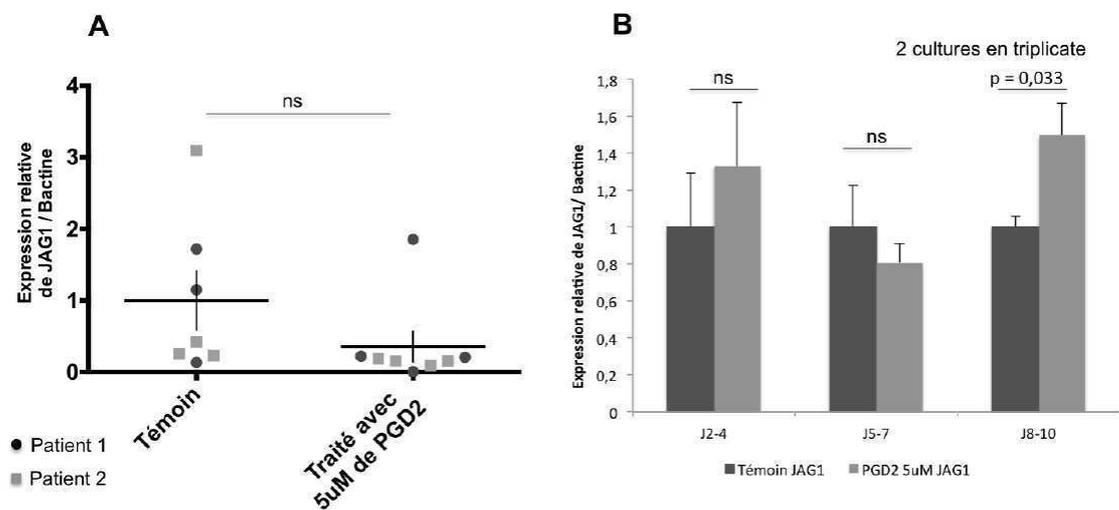
Analyse transcriptionnelle du gène SUSD2



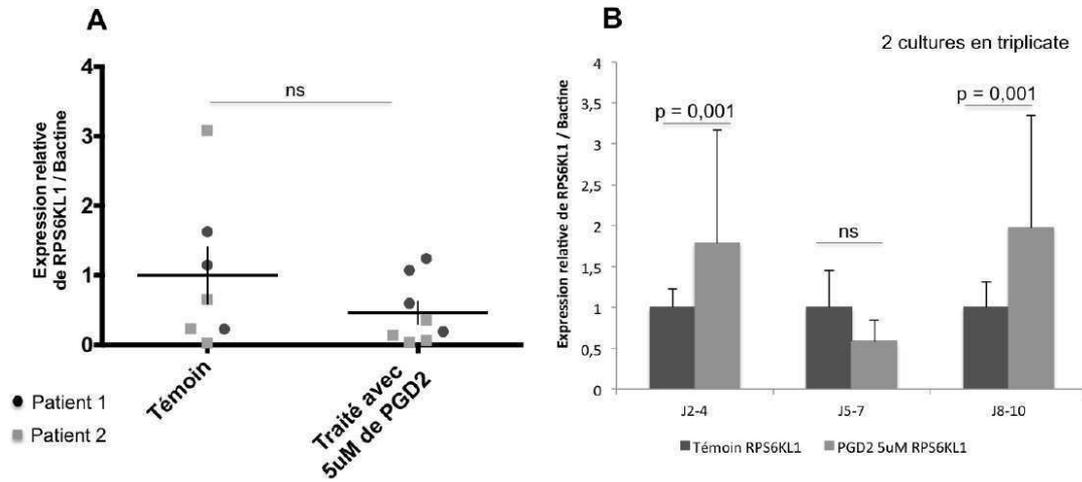
Analyse transcriptionnelle du gène DACT2



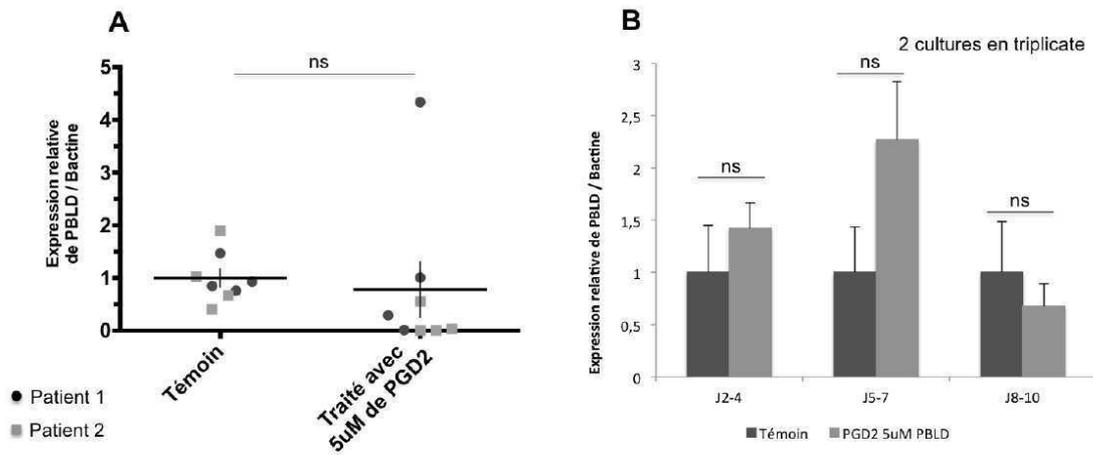
Analyse transcriptionnelle du gène JAG1



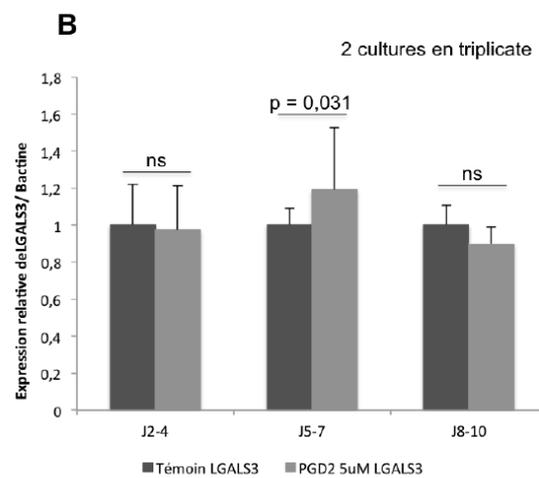
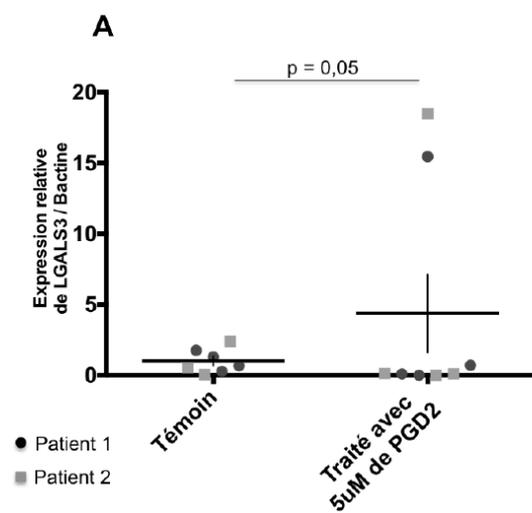
Analyse transcriptionnelle du gène RPS6KL1



Analyse transcriptionnelle du gène PBLD



Analyse transcriptionnelle du gène LGALS3



Titre : Système nerveux entérique : source de prostaglandines D2 et E2. Implication dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Mots clés : Prostaglandine D2, Prostaglandine E2, Système nerveux entérique, Barrière épithéliale intestinale, Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Résumé : Le système nerveux entérique (SNE), constitué de neurones et de cellules gliales entériques (CGE), forme un réseau distribué le long du tractus digestif. Il intervient dans la régulation des fonctions et le contrôle de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale (BEI) selon un mode paracrine *via* la sécrétion de médiateurs solubles. Une implication du SNE dans la physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) n'est pas exclue. Des travaux au sein de l'unité ont démontré la capacité des CGE à sécréter des prostaglandines (PG). Ainsi, nous nous sommes intéressés à la relation paracrine impliquant la PGD2 et la PGE2 au sein de l'unité neuro-glio-épithéliale. En effet, ces médiateurs lipidiques semblent à la fois impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de la BEI et dans la participation à sa rupture en situation inflammatoire. Nos travaux confirment l'implication du micro-environnement des cellules épithéliales intestinales, et en particulier les neurones entériques et les CGE dans la production de PGD2 et PGE2 lors d'un processus inflammatoire. En effet, les neurones et les CGE disposent de la machinerie moléculaire indispensable à cette production *via* l'expression de la LPGDS et de la mPGES1, suggérant que la PGD2 et la PGE2 peuvent avoir une origine neuro-gliale dans la MC. De plus, ils mettent en évidence l'induction de l'expression de ces enzymes chez des patients atteints d'une MC en phase active associée à une diminution de l'expression de PPAR γ et une augmentation de celle d'EP4. Ainsi, nos travaux confortent l'hypothèse de l'implication de ces différents acteurs dans la physiopathologie de la maladie de Crohn (MC).

Title : Enteric nervous system: source of prostaglandin D2 and E2. Implication in Intestinal Bowel Disease.

Keywords : Prostaglandin D2, Prostaglandin E2, Enteric nervous system, intestinal epithelial barrier, Inflammatory bowel disease

Abstract : Neurons and enteric glial cells (EGCs) constitute a network distributed all along the digestive tract, the enteric nervous system (ENS). ENS regulate the intestinal epithelial barrier (IEB) functions in a paracrine manner via the secretion of soluble mediators. ENS involvement in the pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD) is not excluded. Previous studies have demonstrated the ability of EGCs to produce prostaglandins. Thus, we studied the paracrine relationship involving PGD2 and PGE2 within the digestive neuronal-glial-epithelial unit. Indeed, these lipid mediators are involved in the control of IEB homeostasis and in its disruption in proinflammatory condition. Our work confirms enteric neurons and CGE contribution in the production of PGD2 and PGE2 in response to proinflammatory stress. Indeed, ENS express LPGDS and mPGES-1. Moreover, we showed upregulation of LPGDS and mPGES1 expression in the inflamed zone of the colon in patients with active Crohn's disease (CD) associated with downregulation of PPAR γ expression and upregulation of EP4 expression. PGD2 and PGE2 may have a neuro-glial origin in CD. Our study supports the hypothesis of PGD2 and PGE2 metabolic pathways involvement in CD pathophysiology.