

UMR_S 682
Développement et Physiopathologie
de l'Intestin et du Pancréas

Michèle Kedinger
Directeur

<http://u682-inserm.u-strasbg.fr>

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

ulp
UNIVERSITÉ
LOUIS PASTEUR
STRASBOURG

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par Léa RITIÉ-PERTUSA

Recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin normal et pathologique

Soutenue publiquement le 6 mai 2008

Membres du Jury

Directeur de thèse : Dr. Patricia SIMON-ASSMANN	DR2 CNRS	INSERM U682 Strasbourg
Rapporteur interne : Dr. Serge POTIER	Professeur	UMR 7156 ULP Strasbourg
Rapporteur externe : Dr. Florence RUGGIERO	DR2 CNRS	IBCP-UMR 5086 Lyon
Rapporteur externe : Dr. Sylvie DUFOUR	DR2 CNRS	UMR 144 Institut Curie Paris
Examineur : Dr. Philippe CARDOT	Professeur	INSERM U505 Paris

A mes parents,

A mon Amour Nicolas,

A mon petit cœur Jeanne,

Remerciements

Je remercie en premier lieu les membres du jury, Mr Serge Potier, Mme Sylvie Dufour, Mme Florence Ruggiero et Mr Philippe Cardot, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse.

Je remercie ensuite Michèle Kedinger, directrice de cette belle Unité INSERM 682, de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire, de m'avoir soutenue tout au long de ce projet et d'avoir toujours pris le temps de me donner avis et conseils avisés.

Merci à Patricia pour m'avoir encadrée pendant ma thèse, d'avoir toujours été là pour moi malgré les épreuves difficiles. Merci pour tous les conseils apportés, pour l'aide précieuse que tu m'as apportée en me transmettant ton savoir scientifique et en m'épaulant pour la veille bibliographique ! Merci aussi de m'avoir permis de participer à plusieurs congrès internationaux. Je te suis reconnaissante de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté mon investissement dans d'autres projets comme l'enseignement ou l'organisation de BIOTechno. Et je ne rencontrerai pas de sitôt quelqu'un d'aussi, et même plus, chipoteur et perfectionniste que moi !

Merci à Anne-Laure, d'avoir guidé mes premiers pas dans la recherche.

Merci à Olivier, le Grand, « papa » pour les intimes (vous devinez le reste de la famille), tout d'abord pour m'avoir initiée et conseillée en BM. J'ai apprécié de partager ma calculatrice, agrafeuse, troueuse avec toi. Je garderais toujours un bon souvenir de l'époque des parties de bad, des tartes flambées à l'Ange, des bières en terrasse... Et aussi de tes blagues rigolotes et autres taquineries, et de ton grand cœur au quotidien. Mais surtout je te suis infiniment reconnaissante de m'avoir toujours avertie quand j'avais (ou même pas) ma braguette ouverte !

Un petit passage en Bioch (c'était bon les petites pauses du côté de chez vous) pour dire à Jean-François que j'ai apprécié nos nombreuses discussions, presque philosophiques, sur le monde de la recherche et son avenir et sur mon avenir perso. Merci aussi à Patrick, mon très cher maître de biochimie, qui a toujours été enthousiaste pour répondre à mes nombreuses et ô combien compliquées questions, pour les dépannages en tout genre (timer, souris, voiture, chewing gum, carte de cantine, crème pour les mains...) Merci pour toute l'énergie que vous m'avez donnée en me proposant toujours du chocolat et du café !

Maintenant un petit passage au poulailler. Ah ! Que ça fait du bien un petit thé et des petites gourmandises réconfortants, un peu de ragotage et des ballades imaginaires. Claire, Elisabeth, Marie, Annick, Isabelle, Léo, vous êtes vraiment les plus merveilleuses des poulettes ! Je ne vous remercierais jamais assez de m'avoir supportée au quotidien (non, mais alors qu'est-ce que vous en pensez, c'est mieux des tables rondes ou carrées ???) et pour votre aide précieuse pour l'organisation de mon mariage et aussi pour votre merveilleuse chanson qui restera à jamais gravée dans mon cœur (et Yannick au pipeau !). On n'a pas eu le temps de se faire beaucoup de CacoFolies cette année. C'est que partie remise.

Spéciale dédicace à Tati Annick, pour avoir créé avec moi la chorale de la paillasse, pour m'avoir prêté main forte pour les dures heures à l'animalerie, pour avoir vérifié entre 2 pcr s'il y a pas un vol moins cher pour mes vacances, pour les dissections, les dissociations, et l'aide pour les manips cette dernière année.

Merci

A Léo d'être quand même toujours venue à mon secours pour mes pannes et questions informatiques. Et d'avoir été là pour me communiquer les scoops ! Tu le feras toujours par mail, hein ?

A Isabelle, pour les conseils en orthographe et surtout les bons gateaux !!

A Christiane d'avoir toujours été de bon conseil pour l'histo et la culture cell et aussi pour les manips de microscopie électronique.

A Pascal d'être souvent venu me faire un petit coucou.

A Michèle Lavogez, Fanny et Pierre pour l'animalerie.

A Isa de m'avoir toujours montré avec enthousiasme ses achats aux soldes et de m'avoir fait partagé sa passion pour les voyages et la recherche. De te voir, c'est toujours motivant.

A Fairouz, pour sa gentillesse ; je te souhaite bon vent.

Aux autres « chefs » Jean-Noël, Gérard, Marie-Pierre qui m'ont donné le goût du savoir.

A mes « stagiaires », David, Anne-Sophie et Joël d'avoir participé à mon projet.

Mélanie, ma préférée ! Merci pour ta bonne humeur, et pour les délicieuses séances de massages et de réflexologie, pour tous les petits délires. Tu m'as toujours trop fait rire. Tu m'as bien manqué ces derniers temps et tu resteras toujours à l'intérieur de mon cœur !

Alex, mon préféré ! Merci pour ton amitié dès mon arrivée au labo, pour les pauses terrasses en été ou canapé en hiver, pour les petits verres (quand j'avais encore le temps de sortir !), et toutes nos discussions sur le monde et la vie.

C'est plus pareil depuis que vous êtes plus là.

Une pensée pour les anciens. Natacha, qui m'a donné envie de venir dans ce labo, Cécé, ton humour était trop court! Et rappelle- toi : l'important, c'est de toujours finir artistiquement ! Les GG qui nous ont quittés. Je m'attends toujours à vous apercevoir en passant devant le bureau et à partager 2 mots avec Georg, petit Olivier, Christophe, Anthony, Viviane et même Josselin ! Mercé, merci d'avoir gentiment supporté pendant au moins un an mes Holà ! Que tal ? Qui, en fait, ne te faisaient même pas plaisir. Nath, pour les bons moments partagés et notamment cette magnifique organisation de BIOTechno. Marjorie et Carole pour avoir partagé avec moi les plus beaux projets de développement qui existent.

Un clin d'œil à l'ex bureau 316. Fabien, merci pour les bonbons Haribo (mais qu'est-ce que j'ai pu manger dans ce labo !) IVO, super réalisateur sarcastique, ah ! C'était sympa de résoudre tes énigmes en manipulant ! Tu as fini par me faire accrocher à ton humour noir. Ça va même me manquer, j'te jure ! Surtout ton côté acrimonieux. On ira manger au tire-bouchon des fois hein ?

Caro, merci de m'avoir toujours fait partager ton thé ! J'en ai une grosse dette! Merci pour tes coups de main pour les manips de dernière minute. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse.

Un petit coucou aux locataires du 3^{ème}, Dominique, Erwan, Céline, Nadine, Mathilde, Eric. Merci pour les discussions volées quand j'arrivais trop tard au café ! parfois psychadéliques, hein Dominique ! A Erwan aussi pour tes conseils œnologiques et autres, c'est toujours passionnant d'écouter tes explications. Eh ! Je passe ma thèse avant toi finalement !

Une petite attention pour les nouveaux venus avec qui je n'ai pas eu beaucoup le temps de parler et c'est dommage.

Je remercie tous ceux avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants et tous ceux qui ont compensé le manque de soleil à l'intérieur du labo de par leur bonne humeur.

Je sors du labo pour dire un petit mot à mes collègues enseignants, notamment Marc, Marie-Aline, Vincent, Emilie, Sophie, Angélique, bien sûr Joern, et tous les autres... On a passé de bons moments en TP pendant ces 4 années. Faudrait continuer les petites soirées moniteurs.

Je remercie aussi très fort mes 2 chères amies de fac et de toujours, Virginie et Rim, qui ont fait que toutes ses années d'études restent un merveilleux souvenir.

Du fond du cœur merci à Papa et Maman pour tout ce que vous m'avez donné et me donnez toujours. Je vous aime.

Et le meilleur pour la fin ! Merci à toi mon Amour adoré d'être à mes côtés, de me donner tant de joies et d'amour. Merci pour tout ce qu'on partage. Tu as aussi contribué à mon projet de thèse car même si ça t'endormait vite quand j'en parlais, tu m'as apporté un soutien moral, le recul et l'épanouissement qui sont nécessaires pour un bon travail. Je t'en remercie et je t'aime. La vie avec toi et notre petit ange est merveilleuse.

**Ce travail de thèse a été financé par le Ministère de la Recherche et de
L'Enseignement Supérieur, par l'Université Louis Pasteur de Strasbourg
et par l'Association pour la Recherche sur le Cancer.**

Qui ne connaît pas la folie ne peut être sage.

Un sourire coûte moins cher que l'électricité mais il donne autant de lumière. [Abbé Pierre]

(Deux citations qui me correspondent)

Sommaire

Rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin normal et pathologique

Liste des abréviations.....	12
INTRODUCTION.....	14
I. L'intestin.....	16
A. Anatomie et structure histologique.....	16
B. Fonctionnement physiologique de l'intestin.....	18
1. Fonction digestive.....	18
a) <i>Digestion intraluminaire</i>	18
b) <i>Digestion à la surface des entérocytes et absorption</i>	19
c) <i>Élimination des résidus et fonction digestive du côlon</i>	20
2. Défense de l'organisme.....	20
3. Fonction endocrinienne.....	20
4. Homéostasie intestinale par renouvellement cellulaire.....	20
5. Contrôle de la motricité intestinale.....	21
C. Développement de l'intestin.....	22
1. Selon l'axe crânio-caudal.....	22
2. Selon l'axe crypto-villositaire.....	22
3. Mise en place du système nerveux.....	24
4. Régulation moléculaire de la morphogenèse intestinale.....	25
a) <i>Régulation extrinsèque</i>	25
b) <i>Régulation intrinsèque</i>	25
c) <i>Importance des interactions épithélio-mésenchymateuses</i>	26
II. Les laminines, éléments clés des lames basales.....	28
A. Généralités sur la lame basale.....	28
B. Les lames basales intestinales.....	29
C. Les laminines.....	31
1. Structure.....	31
a) <i>Domaine G</i>	31
b) <i>Domaines I et II</i>	31
c) <i>Domaines III et V</i>	31
d) <i>Domaines IV</i>	31
e) <i>Domaines VI</i>	31
2. Expression tissulaire et implications physiologiques et pathologiques.....	34
3. Les laminines dans l'intestin.....	34
a) <i>Laminine-111 et -121</i>	34
b) <i>Laminine-211 et -221</i>	35
c) <i>Laminine-311 et -332</i>	35
d) <i>Laminine-411 et -421</i>	37
e) <i>Laminine-511, -521 et -522</i>	37
III. La chaîne $\alpha 5$ de laminine.....	37
A. Le gène Lama5.....	37
B. Profil d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine.....	37

C. Modèles murins d'étude <i>in vivo</i>	38
1. Invalidation génique de la chaîne $\alpha 5$	38
2. Lama5 « trap ».....	38
3. Souris transgénique exprimant une chaîne α chimérique	39
4. Souris exprimant un allèle hypomorphe de la chaîne $\alpha 5$	40
5. Invalidation conditionnelle de la chaîne $\alpha 5$ dans le poumon	40
6. Souris transgénique sur-exprimant la chaîne $\alpha 5$	40
D. Etudes <i>in vivo</i> des fonctions biologiques de la chaîne $\alpha 5$	41
1. Syndactylie.....	41
2. Exencéphalie.....	42
3. Dymorphogenèse placentaire.....	42
4. Défauts de la morphogenèse rénale.....	44
5. Défauts du développement pulmonaire.....	46
6. Défauts de morphogenèse des glandes salivaires.....	48
7. Défauts du développement dentaire.....	48
8. Défauts de morphogenèse des follicules pileux.....	50
9. Défaut de migration des cellules de la crête neurale.....	51
10. Implication dans le système nerveux central.....	51
11. Phénotype intestinal des souris Lama5-/-.....	52
E. Implications de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans des pathologies	55
IV. Les récepteurs de la chaîne $\alpha 5$ de laminine	55
A. Les intégrines	56
B. Le dystroglycane	58
C. Les syndécanes	60
D. Le Luthéran	61
E. Domaines de liaison de la chaîne $\alpha 5$ avec ses récepteurs	62
1. Sites d'interaction sur le domaine G de la région COOH-terminale.....	62
2. Sites d'interaction au niveau NH ₂ -terminal.....	62
3. Sites d'interaction du domaine IVa.....	64
OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT	65
RESULTATS	69
<u>Partie 1</u> : Recherche des gènes cibles et des voies de signalisation régulés par la chaîne $\alpha 5$ de laminine et détermination de son rôle biologique dans l'intestin	70
I. Base du travail	72
II. Résumé des résultats	72
III. Eléments de Matériels et Méthodes	76
A. Techniques relatives à l'hybridation différentielle sur puce à ADNc	77
1. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN total d'intestin embryonnaire.....	77
2. Personnalisation des puces à ADNc.....	78
3. Constitution des puces à ADNc.....	81
4. Expérience de « microarray » ou hybridation différentielle sur puce à ADN.....	82
B. Modèles de culture cellulaire et applications	85
1. Mise en place de modèles cellulaires.....	85

a) <i>Modèles embryonnaires</i>	85
b) <i>Modèles de cellules matures</i>	85
2. Applications.....	88
a) <i>Description du système TOPFLASH</i>	88
b) <i>Transfection cellulaire et lecture de la luminescence</i>	88
C. Technique d'immunoprécipitation de chaîne de laminine	89
IV. Publication 1 : Identification of laminin $\alpha 5$ gene signature in developing intestine	90
V. Résultats complémentaires	127
A. Analyse transcriptomique : « clustering » des gènes sortis lors de la première étape de sélection	129
B. Relation laminine-511 – voie Wnt	129
1. Etude de la régulation de la voie Wnt par la laminine-511 <i>in vitro</i> dans les cellules intestinales.....	129
2. Analyse de l'expression de Wnt10b et Fzd2 dans les bourgeons dentaires de souris Lama5-/-.....	131
C. Relation Laminine-511 – voie Akt	133
1. Analyse de l'expression et de l'activation d'Akt <i>in vivo</i> dans les deux compartiments tissulaires de l'intestin embryonnaire.....	133
2. Analyse de l'expression et de l'activation d'Akt <i>in vitro</i> dans les cellules intestinale matures.....	133
a) <i>Akt est spécifiquement activé par la laminine-511</i>	133
b) <i>Analyse de l'expression de PTEN dans les cellules intestinales cultivées sur laminine-511</i>	135
c) <i>Recherche du récepteur membranaire impliqué dans l'activation d'Akt par la laminine-511</i>	135
d) <i>Recherche des substrats activés en aval de l'activation d'Akt par la laminine-511</i>	137
D. Détermination du rôle cellulaire de la chaîne $\alpha 5$	138
1. Confirmation du rôle de la laminine-511 dans la survie des cellules épithéliales intestinales par d'autres techniques.....	138
2. Détermination du rôle cellulaire de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les cellules mésenchymateuses de l'intestin embryonnaire.....	139
E. Identification d'une nouvelle isoforme de laminine dans l'intestin	140
VI. Discussion des résultats	142
<u>Partie 2</u> : L'inactivation génique d'un récepteur de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, le Luthéran, engendre des anomalies rénales et intestinales chez la souris	148
I. Base du travail	149
II. Résumé des résultats	149
III. Publication 2 : Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse.	150
IV. Résultats complémentaires	166
A. Détail de l'analyse des paramètres généraux corporels, physiologiques et biochimiques	167
B. Analyse de la fonction musculaire	170

V. Discussion des résultats.....	172
Partie 3 : Caractérisation d'anomalies d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la maladie de Hirschsprung.....	175
I. Base du travail.....	177
II. Résumé des résultats.....	177
III. Publication 3 : The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation.....	179
IV. Discussion des résultats.....	191
Partie 4 : Analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les carcinomes coliques.....	194
I. Introduction sur les cancers colorectaux et base du travail.....	196
II. Résultats.....	201
A. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome <i>in situ</i>	201
B. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant la sous muqueuse.....	201
C. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les adénocarcinomes envahissant la musculuse.....	201
D. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les adénocarcinomes envahissant la séreuse.....	202
E. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant le péritoine.....	202
III. Discussion des résultats.....	208
Partie 5 : Identification des facteurs de transcription essentiels à la différenciation épithéliale de l'intestin.....	210
I. Résumé des résultats.....	211
II. Publication 4 : Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation.....	212
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	228
I. Rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin normal.....	229
A. Rôle dans la morphogenèse intestinale.....	229
B. Rôle dans la différenciation des cellules intestinales.....	229
1. Rôle dans la différenciation tardive des entérocytes.....	229
2. Rôle dans la différenciation des cellules musculaires lisses.....	231
C. Rôle dans la prolifération des cellules intestinales.....	231
D. Rôle dans la survie des cellules intestinales.....	232
E. Rôle dans la migration des cellules épithéliales.....	233
II. Rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin pathologique.....	233
A. Dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ dans la maladie de Hirschsprung.....	233
B. Dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ dans les cancers colorectaux.....	234
III. Perspectives.....	235

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237
ANNEXES	251
Annexe 1 : Liste des gènes sur-exprimés dans au moins 2 échantillons d'intestins Lama5-/- sur 4 analysés (première étape de sélection)	252
Annexe 2 : Liste des gènes sous-exprimés dans au moins 2 échantillons d'intestins Lama5-/- sur 4 analysés (première étape de sélection)	256
Annexe 3 : Liste des publications et communications	261
Annexe 4 : Nouveau Chapitre de la Thèse : Valorisation des compétences	264

Liste des abréviations

AMV : Avian Myeloblastosis Virus
Apo : Apolipoprotéine
BAD : Bcl2 Antagonist of cell Death
BCAM : B-Cell Adhesion Molecule
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine
BSA : Bovine Sérum Albumine
CCK : Cholécystokinine
CCR : Cancer colorectal
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
CIIP : Chronic Idiopathic Intestinal Pseudo obstruction
CIN : Chromosomal INstability
CTMP : Carboxy-Terminal Modulator Protein
DAPI : Di Aminido Phenyl Indol
DEAE : Diethylaminoethyl
DGC : Dystrophin-associated Glycoprotein Complex
DKK 1 : Dickkopf homologue 1
DTE : dithioérythritol
DTT : dithiothri-.etol
Dvl : Dishevelled
E : jour de vie embryonnaire
ECE1 : Endothelin- Converting Enzyme 1
EDNRB : Endothelin Receptor Type B
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
EPHB : ephrin receptor
EST : Expressed Sequence Tag
EUP : Eau Ultra Pure
FABP : Fatty Acid Binding Protein
FAK :Focal Adhesion Kinase
FAP : Familial Adenomatous Polyposis
FGF : Fibroblast Growth Factor
Fhl1 : Four-and-a-Half LIM Domains 1
Fzd : Frizzled
GAG : Glycoaminoglycane
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue
GC : glucocorticoïde
GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
Gfr α 1 : GDNF Family Receptor Alpha-1
GIP : Gastric Inhibitory Peptide
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
HD : Hemidesmosomal Protein
HLX : H.20-Like Homeobox
HMGCS : 3-@Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase
HNF : Hepatocyte Nuclear Factor

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
HNRP : Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein
HOX: homeobox
ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IHH : Indian HedgeHog
ILK : Integrin-Linked Kinase
IRS : Insulin Receptor Substrate
JAK : Janus Kinase
LEF : Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1
LOH : Loss Of Heterozigosity
LPH : lactase-phlorizine hydrolase
LRP : Low density Lipoprotein Receptor-Related Protein
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MIN : Microsatellite Instability
MMP : Matrix Metalloproteinase
MSX : Muscle Segment Homeobox
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium
MyoD : Myogenic Differentiation Antigen
NEM : N-étylmaléimide
P : jour de vie post-natale
PBS : Phosphate Buffer Saline
PK1 : 3-@Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
PH : Plekstrin Homology
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2 : Phosphoinositol diphosphate
PITX2 : Pituitary Homeobox 2
PLAT : Plasminogen Activator Tissue
PMSF : phenylmethanesulphonylfluoride
PTEN : Phosphatase and Tensin Homologue
RAR : Récepteur à l'Acide Rétinoïque
RB :
RER : Replication ERor
RNAi : RNA interference
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
SDS : dodécyl sulfate de sodium
SFRP : Secreted Frizzled-Related Protein
SHH : Sonic HedgeHog
shRNA : small hairpin RNA
SI : saccharase isomaltase
SSC : sodium salt citrate
STK : Serine/Threonine Protein Kinase
TBE : Tris-Base 45mM, acide orthoborique 47mM, EDTA 1,25mM, pH 8,3
TCF : T-Cell Transcription Factor
TENS : voir master joel
TGFR : Transforming Growth Factor-Beta Receptor
TGF : Transforming Growth Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIP : Vasoactive Intestinal Peptide
WIF : Wnt Inhibitory Factor

INTRODUCTION

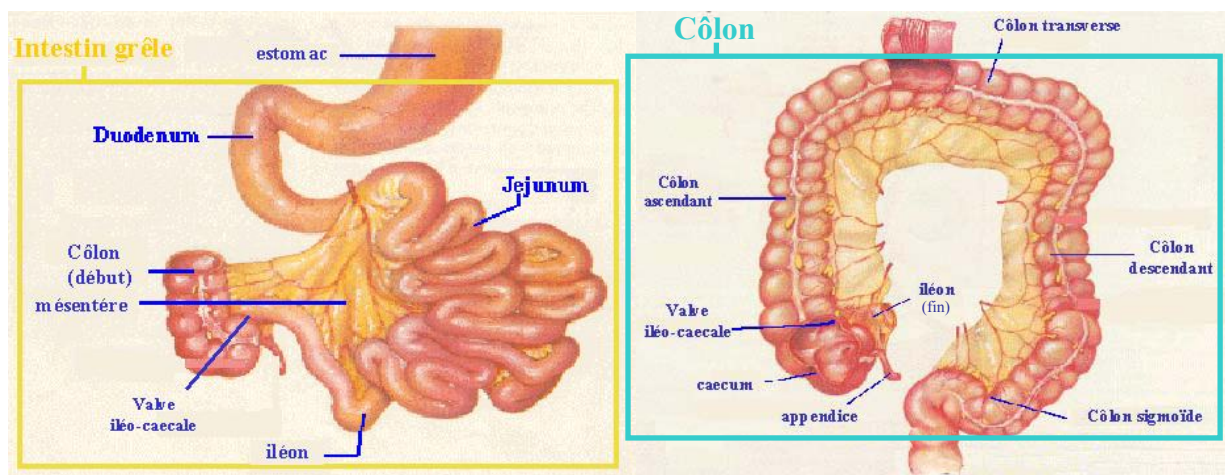


Figure 1 : Anatomie de l'intestin

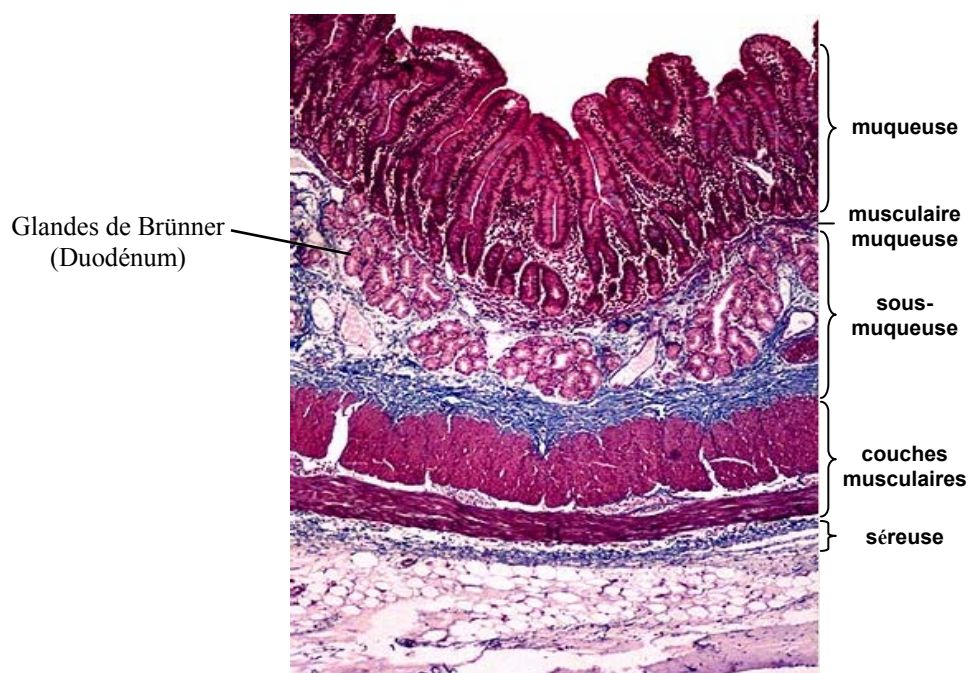


Figure 2 : Histologie de l'intestin

I. L'intestin

A. Anatomie et structure histologique

L'intestin est la partie du système digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus. C'est la partie du corps qui assure l'assimilation dans le sang des nutriments provenant des aliments. L'intestin présente une régionalisation crânio-caudale caractérisée par des spécificités morphologiques et fonctionnelles à chaque niveau. Chez les humains et la plupart des mammifères, il est ainsi divisé en deux parties appelées l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle est lui-même subdivisé en 3 parties : (i) le duodénum, qui fait immédiatement suite à l'estomac, qui commence au pylore et va jusqu'à l'angle duodéno-jéjunal, où débouchent les canaux excréteurs du pancréas et des voies biliaires, (ii) le jéjunum, segment intermédiaire et (iii) l'iléon qui débouche dans le côlon à la hauteur de la valve iléo-caecale. Le gros intestin comprend le caecum, auquel est rattaché l'appendice, le côlon, le rectum et l'anus. Le côlon s'étend du caecum au rectum et se divise en 4 segments : le côlon ascendant ou droit, le côlon transverse ou horizontal, le côlon descendant ou gauche et le côlon sigmoïde (figure 1).

D'un point de vue histologique, la paroi de l'intestin comprend, de l'extérieur vers la lumière du tube: la séreuse, deux couches musculaires longitudinale et circulaire, le tissu conjonctif sous muqueux, la musculaire muqueuse et la muqueuse formée elle-même d'un core conjonctif (lamina propria) recouvert de l'épithélium intestinal qui borde la lumière (figure 2).

L'intestin grêle présente des spécificités histologiques notables au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse et est caractérisé par l'amplification considérable de la surface d'échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Ce phénomène est lié :

- sur le plan anatomique, à la longueur considérable de l'intestin grêle replié en anses intestinales
- à la présence d'innombrables petites évaginations de la muqueuse, hautes de 0,5 à 1 millimètre, donc discernables à l'oeil nu, les villosités intestinales
- à la présence d'une multitude de microvillosités, visibles en microscopie électronique, à la surface de l'épithélium de revêtement de la muqueuse, formant le "plateau strié" visible en microscopie photonique
- au fait que, chez l'homme, la sous-muqueuse possède des soulèvements macroscopiques permanents qui constituent les « valvules conniventes ».

La muqueuse de l'intestin grêle peut être décrite en deux étages : un étage de villosités et un étage de cryptes (ou glandes de Lieberkühn) (figure 3A).

⇒ **L'étage des villosités** comporte les villosités intestinales, évaginations en doigt de gant de la muqueuse vers la lumière, avec un axe villositaire tapissé par l'épithélium de surface prismatique simple, constitué de 3 types cellulaires (figures 3B et C):

- les **entérocytes** ou cellules absorbantes, les plus nombreuses (environ 90% des cellules épithéliales), prismatiques avec un noyau ovalaire basal et une bordure en brosse apicale formée de microvillosités
- les **cellules à mucus** ou caliciformes au pôle apical large, clair et au pôle basal étroit, caractérisées par la présence de grains de mucus
- les **cellules endocrines** avec leur aspect en poire et leurs grains de sécrétion au pôle basal.

L'axe central des villosités, nommé **lamina propria**, comporte un tissu conjonctif lâche (chorion), des fibres musculaires lisses et notamment le muscle de Brücke (expansion perpendiculaire de la musculaire muqueuse), le chylofère central (vaisseau lymphatique en cul de sac), un réseau de capillaires sanguins en position sous épithéliale et de nombreuses cellules immunitaires (figure 3A).

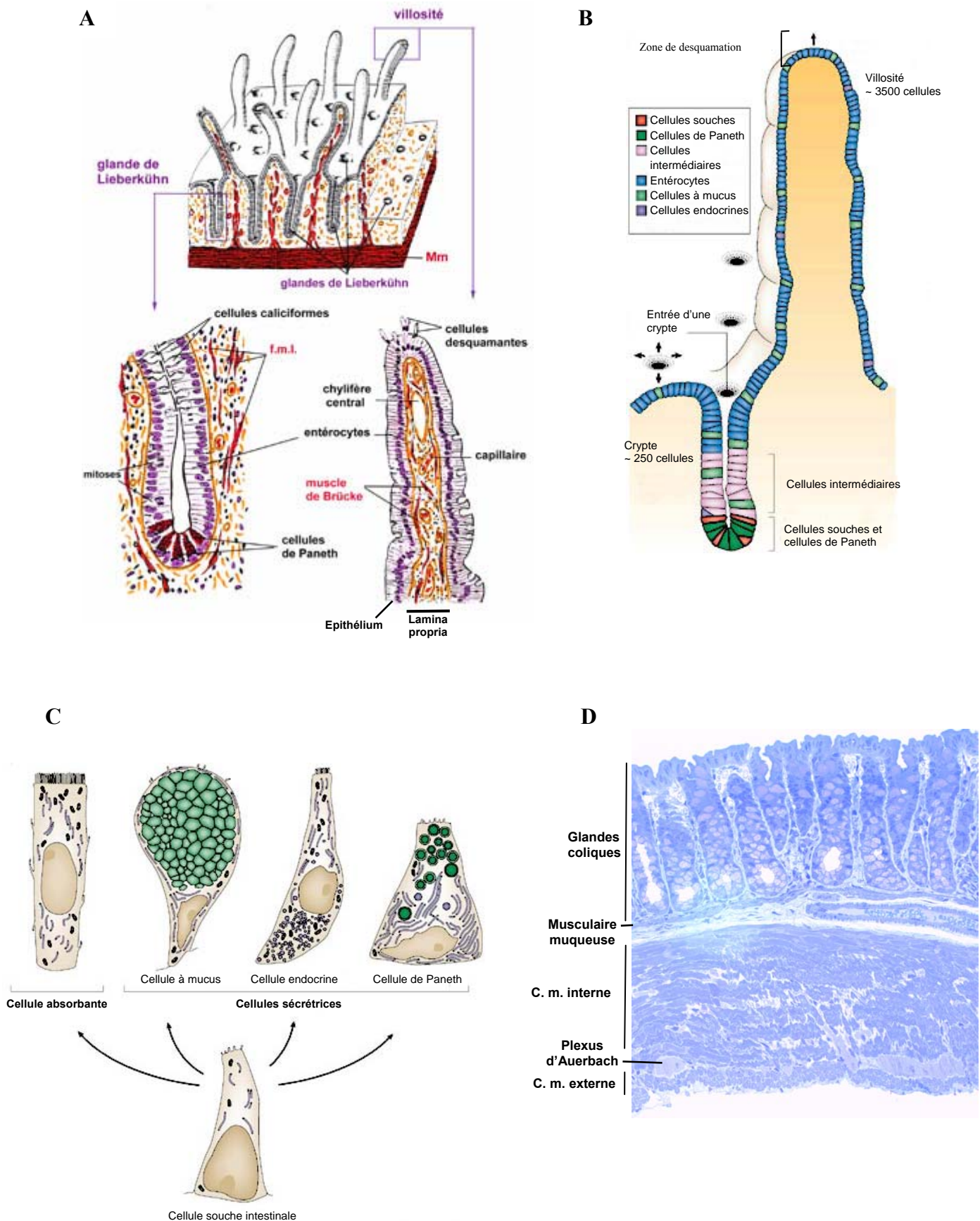


Figure 3 : Constitution de l'intestin

(A) Schéma représentatif des 2 étages de la muqueuse de l'intestin grêle (N. Vacheret, UCB Lyon)

Mm : musculaire muqueuse, fml : fibres musculaires lisses

(B) Distribution des différents types de cellules épithéliales dans l'intestin grêle (Crosnier et al., 2006)

(C) Représentation schématique des différents types de cellules épithéliales intestinales (Crosnier et al., 2006)

(D) Histologie du colon sur coupe semi-fine

L'intestin grêle possède par ailleurs son tissu lymphatique immunocompétent propre, à savoir les plaques de Peyer qui sont particulièrement abondantes au niveau de l'iléon. Les plaques de Peyer apparaissent comme des dômes entre les villosités. Elles sont recouvertes d'un type particulier de cellules épithéliales, les cellules M (microfold) qui captent les antigènes luminaux jusqu'aux follicules lymphoïdes sous-jacents.

⇒ **L'étage des cryptes** comporte des glandes de Lieberkühn invaginées en doigt de gant et qui s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités. Outre les types cellulaires trouvés dans les villosités, les cryptes comportent des **cellules de Paneth**, qui se situent au fond des glandes et qui présentent des granules apicaux denses. De plus, cette région est définie comme zone proliférative, attestée par la présence de **cellules souches** et de cellules dites **intermédiaires**, immatures et encore capables de se diviser (figure 3A, B et C).

Au niveau de la sous-muqueuse, le duodénum présente la particularité de contenir des glandes muqueuses tubuleuses composées appelées « glandes de Brünner » (figure 2).

Au niveau du côlon, on assiste à la disparition des "dispositifs augmentant la surface d'échange" qu'on observait dans l'intestin grêle (pas de valvules conniventes, pas de villosités intestinales, moins d'entérocytes donc moins de microvillosités) (figure 3D).

A cet étage du tube digestif, on observera des caractéristiques histologiques spécifiques notables au niveau de la muqueuse :

La muqueuse colique présente en effet une surface plane, sans villosité et creusée de profondes glandes tubuleuses droites. L'épithélium prismatique présente une nette diminution du nombre des entérocytes et des cellules endocrines et une absence de cellules de Paneth. Par contre, l'épithélium colique est très riche en cellules à mucus dont l'abondance est de plus en plus marquée quand on approche du rectum.

Le chorion est riche en tissu lymphoïde: lymphocytes diffus et plaques de Peyer débordant vers la musculaire muqueuse.

B. Fonctionnement physiologique de l'intestin

1. Fonction digestive

La fonction de l'appareil digestif est d'assimiler les aliments ingérés. C'est en effet au niveau de l'intestin que se fait le passage des molécules alimentaires dans le milieu intérieur. Cette assimilation se déroule en trois étapes : (i) La digestion (fragmentation des grosses molécules en molécules plus petites dans la lumière intestinale). Cette réduction se produit en plusieurs phases : tout d'abord dans la lumière intestinale par les enzymes pancréatiques, puis sur les entérocytes par les enzymes membranaires et pour finir dans l'épithélium grâce aux enzymes cytoplasmiques. (ii) L'absorption correspond ensuite au transport des nutriments à travers la muqueuse intestinale vers les liquides de l'organisme. (iii) La transformation des aliments se termine par l'élimination des déchets. C'est le rôle principal du côlon qui est le siège de l'absorption d'eau et d'électrolytes.

a) Digestion intraluminal

Le duodénum reçoit le chyme gastrique, imprégné des enzymes salivaires et stomacales, et libéré par le pylore. Il sécrète des hormones telles la **sécrétine** qui neutralise l'acidité du chyme sortant de l'estomac, et la **cholécystokinine** qui stimule l'activité du pancréas et entraîne la contraction de la vésicule biliaire. Les enzymes pancréatiques et la bile vont alors se déverser dans le duodénum. Le suc intestinal comprend de l'eau, des éléments minéraux assurant un pH neutre ou basique, des enzymes et des mucines. Les cellules des glandes de Brünner sécrètent également du mucus, favorisant la protection de la paroi intestinale contre l'acidité gastrique, et des bicarbonates, sécrétion basique nécessaire à l'action des enzymes intestinales. La digestion intraluminal met en

jeu les enzymes pancréatiques et la bile. Le **suc pancréatique** contient quatre enzymes. La **trypsine** et la **chymotrypsine** agissent sur la digestion des protéines, l'**amylase pancréatique** sur la digestion des sucres et la **lipase** sur la digestion des graisses. La **bile** contient des sels biliaires facilitant la digestion des graisses en les réduisant à des particules de petite taille pouvant ainsi être directement absorbées.

Les **sucres** sont ainsi transformés en **disaccharides**, les **protéines** en **petits peptides** et les **lipides** en **micelles** (complexes de monoglycérides ou d'acides gras avec les sels biliaires).

Le glycocalyx, formé de longs filaments glycoprotéiques, recouvre les microvillosités; il assure un rôle de protection contre l'autodigestion, un rôle de filtre sélectif et permet l'adsorption des enzymes pancréatiques qui procèdent à la digestion intraluminaire.

b) Digestion à la surface des entérocytes et absorption

La deuxième phase de digestion est membranaire. Les entérocytes, par la présence d'enzymes au niveau des microvillosités, assurent les étapes finales de la digestion et sont le siège de l'absorption des nutriments, de l'eau, des sels minéraux et des vitamines.

- Des **disaccharidases** réduisent les disaccharides en **monosaccharides** absorbés et transportés à travers la cellule jusqu'au pôle basal ; les monosaccharides traversent la membrane basale de l'épithélium intestinal, puis celle des capillaires sanguins contenus dans le chorion et suivent le trajet veineux les conduisant à la veine porte par laquelle ils pénètrent dans le foie (figure 4).

- Des **oligopeptidases** transforment les petits peptides en **acides aminés** qui traversent la cellule et se retrouvent également dans le système porte.

- Alors que les monosaccharides et les acides aminés sont absorbés directement, les acides gras et les monoglycérides contenus dans les micelles subissent une transformation particulière dans la cellule absorbante intestinale. Ils diffusent simplement à travers la membrane de la cellule intestinale ceci du fait de leur solubilité dans la couche de phospholipides de la membrane. Au niveau du reticulum endoplasmique, les acides gras, les monoglycérides et le glycérol sont rassemblés pour la resynthèse de triglycérides et de phospholipides qui se retrouvent enveloppés par des lipoprotéines pour former des **chylomicrons**. Les chylomicrons sont alors expulsés de la cellule par exocytose au niveau du pôle basal des entérocytes puis pénètrent dans le chylifère central pour aboutir dans le canal thoracique.

L'absorption des nutriments débute ainsi dans le duodénum, mais est particulièrement importante dans le jéjunum et l'iléon où la surface d'échanges est la plus grande.

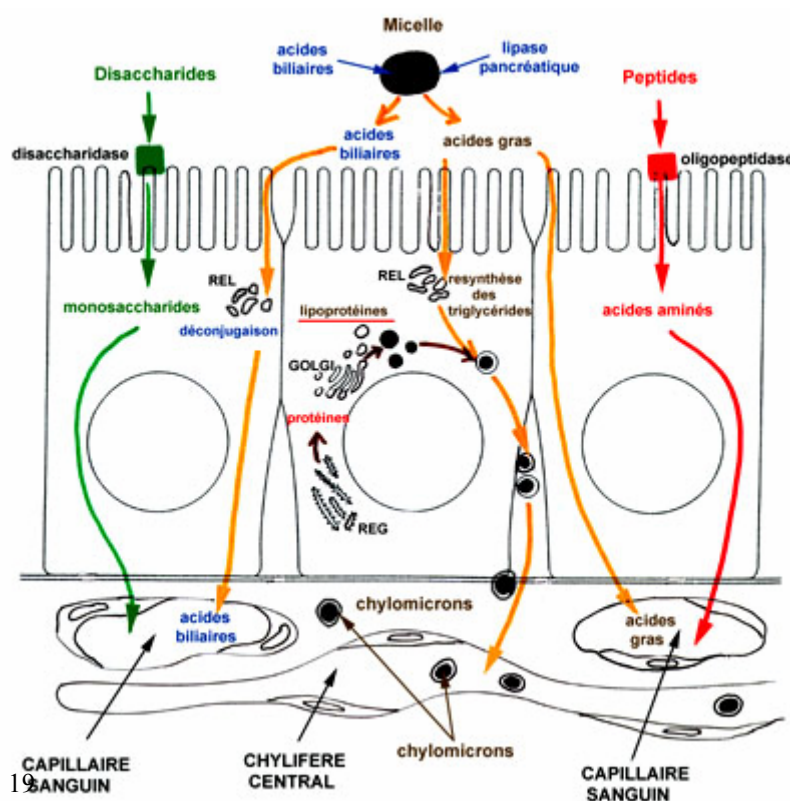


Figure 4 : Schéma représentatif de la digestion entérocytaire

c) Elimination des résidus et fonction digestive du colon

Les fonctions essentielles du côlon sont l'**absorption d'eau** transformant les résidus alimentaires liquides de l'intestin grêle en un matériau semi-solide, les fèces, la lubrification des fèces et leur propulsion vers le rectum. La fonction digestive du gros intestin est assurée par la flore intestinale abondante, constituée de bactéries commensales, assurant la dégradation des résidus alimentaires et la synthèse de vitamines (vitamines du groupe B dont l'acide folique, vitamine K).

2. Défense de l'organisme

Le système immunitaire intestinal, appelé GALT, pour «Gut Associated Lymphoid Tissue», concentre à lui seul 70% des cellules lymphoïdes de l'organisme. Dans le tractus intestinal, l'échantillonnage des antigènes, prélude au déclenchement d'une réponse immunitaire locale ou systémique, a lieu majoritairement au niveau des **plaques de Peyer**. Elles sont constituées de follicules lymphoïdes recouverts par un épithélium particulier contenant les cellules M, qui ont la capacité de transporter toutes sortes de particules, bactéries et virus présents dans la lumière intestinale et de les délivrer intacts au niveau du follicule lymphoïde sous-jacent. Ces particules et micro-organismes sont alors capturés et traités par les cellules dendritiques et les macrophages muqueux, étape initiale du déclenchement d'une réponse immunitaire locale ou de l'acquisition d'une tolérance.

Par ailleurs, la **flore intestinale** prévient, par son équilibre, la colonisation par des bactéries pathogènes.

Les **cellules caliciformes** sécrètent du mucus qui protège l'épithélium. Le mucus constitue une barrière physique de protection contre les enzymes intraluminales, le frottement des matières en cours de digestion, les micro-organismes et les toxines qu'ils produisent. Le mucus ne constitue pas seulement une barrière physique ; c'est aussi un inhibiteur compétitif de l'adhésion des microorganismes aux cellules épithéliales.

La fonction des **cellules de Paneth** demeure encore obscure. Elles ont la caractéristique ultrastructurale de posséder des grains de zymogène et une richesse en ergastoplasme. Elles participent à la défense contre les agents infectieux en produisant du lysozyme et des peptides anti-microbiens, les défensines 5 et 6.

3. Fonction endocrinienne

Le rôle endocrinien de l'intestin est assuré par les **cellules endocrines** qui sécrètent des hormones permettant le contrôle de la digestion et d'autres fonctions de l'organisme. On décrit actuellement une quinzaine de types de cellules endocrines dans l'épithélium intestinal; citons les cellules à sérotonine (contraction du muscle lisse, rôle important dans la segmentarisation et le péristaltisme), à entéroglucagon, à gastrine (stimulation de la sécrétion pancréatique, contraction du muscle lisse), à somatostatine, à sécrétine (inhibition de la sécrétion d' HCl, stimulation de la sécrétion pancréatique), à cholécystokinine (CCK), à VIP (vasoactive intestinal peptide), à GIP (gastric inhibitory peptide), à substance P, à bombésine.

4. Homéostasie intestinale par renouvellement cellulaire (Crosnier et al., 2006)

L'intestin constitue le système de l'organisme ayant le plus fort taux de renouvellement cellulaire. L'épithélium intestinal est en perpétuelle régénération avec un temps record de renouvellement de 2 à 3 jours, sauf pour les cellules de Paneth pour lesquelles il serait beaucoup plus long (1 mois environ). Ce renouvellement rapide compense les phénomènes de digestion cellulaire liés à la richesse en enzymes digestives du contenu intestinal. Le nombre constant de

cellules dans une villosité est le fait d'un équilibre entre la prolifération des cellules au niveau des cryptes et la perte des cellules en haut des villosités.

Ce sont les **cellules souches** qui assurent ce renouvellement de l'épithélium intestinal. Les cellules souches intestinales sont des cellules prismatiques indifférenciées et pluripotentes, et sont confinées au fond des cryptes de Lieberkühn. Chaque cellule souche peut donner naissance à deux populations de cellules en division dites **cellules intermédiaires**, soit précurseurs des cellules **absorbantes**, soit précurseurs des cellules **sécrétrices** (cellules à mucus, endocrines et cellules de Paneth) (figure 3B et C). La division de ces cellules intermédiaires va permettre l'amplification considérable de la progéniture résultant de la division d'une cellule souche. Dans l'intestin grêle, les cellules intermédiaires se différencient ensuite le long de l'axe cryptovillositaire. Les cellules différenciées sont fonctionnelles et migrent le long des villosités, puis sont éliminées en haut des villosités dans la lumière intestinale. Ces phénomènes ont été démontrés par des expériences d'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules en division.

Le mécanisme moléculaire qui contrôle le renouvellement cellulaire intestinal correspond en fait à une coopération des voies de signalisation **Wnt** et **Notch**. Les facteurs solubles Wnt sont sécrétés soit par les cellules épithéliales elles-mêmes soit par les fibroblastes environnants et activent des récepteurs transmembranaires Frizzled empêchant ainsi la formation du complexe protéique APC/GSK-3 β /Axine et donc la dégradation de la β -caténine par le protéasome. La β -caténine peut alors se lier à un facteur de transcription TCF/LEF et leur translocation nucléaire active alors la transcription de gènes impliqués notamment dans la prolifération tel que c-myc ou la cycline D1. L'activation de la voie Wnt est restreinte au compartiment prolifératif des cryptes où elle permet le **maintien de la prolifération des cellules souches et des cellules intermédiaires**. Les protéines Notch et leur ligands Delta ou Jagged sont des protéines transmembranaires qui médient une communication entre 2 cellules voisines en contact, leur dictant des destinées différentes. L'expression des protéines de la voie Notch, également appelée voie d'inhibition latérale, est également limitée au compartiment des cryptes. L'activation de la voie Notch est requise pour la prolifération des cellules souches et des cellules intermédiaires. Les voies Wnt et Notch coopèrent aussi pour le **déterminisme du lignage sécrétoire** (du moins pour les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines). Les modèles d'inhibition de la voie Wnt (délétion de Tcf4 ou surexpression de DKK1 (dickkopf homologue 1) conduisent à une perte des cellules prolifératives et des cellules sécrétrices. Les modèles d'inhibition de la voie Notch (telle la délétion du gène cible Hes1) conduisent eux à une augmentation des cellules sécrétrices. Le lignage sécrétoire dépend aussi de l'expression du facteur de transcription Math1. La délétion de Math1 chez la souris entraîne en effet une perte de toutes les cellules sécrétrices. En résumé, les cellules souches nécessitent des voies Wnt et Notch actives (Wnt+, Notch+). Les cellules qui perdent l'activation de la voie Notch (Math1+, Wnt+, Notch-) deviennent des précurseurs de cellules sécrétrices. Au sein du lignage sécrétoire, le déterminisme des cellules entéroendocrines dépend du facteur à bHLH Ngn3 (Jenny et al., 2002). La différenciation des cellules à mucus nécessite l'expression de Klf4 (Katz et al., 2002). Les cellules qui perdent Wnt (Math-, Wnt- et Notch+) deviennent des précurseurs des cellules absorbantes. La différenciation des deux types de cellules précurseurs requiert de toute façon, au final, une inactivation de la voie Wnt. La **ségrégation** (répartition le long de l'axe cryptovillositaire) des différents types cellulaires se fait ensuite sous la dépendance de l'éphrine B1 et de ses récepteurs EPHB2 et EPHB3. Ce sont des protéines associées à la membrane qui constituent un système de répulsion cellulaire et dont le contrôle de l'expression se fait par la voie Wnt.

5. Contrôle de la motricité intestinale

Le contrôle de la motricité de l'intestin, essentiel à la progression du bol alimentaire, est assuré par le **système nerveux entérique**. Ce système s'organise en un réseau ou plexus ganglionné, où les ganglions contiennent les corps cellulaires des neurones entériques et les cellules de la glie. Les mailles de ce réseau représentent les axones des neurones qui réalisent un circuit complexe

de projections locales. On décrit deux niveaux pour ce système : le **plexus sous-muqueux de Meissner**, qui contrôle les sécrétions intestinales, et le **plexus myentérique d'Auerbach**, localisé entre les deux couches de la musculature, qui commande le péristaltisme (figure 3d). Ces deux types de plexus fonctionnent de manière tout à fait coordonnée. Le système entérique comporte environ 200 millions de neurones de 4 types : neurones sensitifs (mécano-, thermo- ou chémorécepteurs), neurones moteurs, neurones glandulaires et interneurones. Le système nerveux entérique est connecté au système nerveux central via le nerf vague qui assure la fonction sensorielle. S'ajoutent à ce système, les **cellules interstitielles de Cajal** qui sont des cellules « pacemaker » dérivant elles du mésenchyme intestinal et impliquées dans le contrôle de la motilité digestive.

C. Développement de l'intestin

La morphogenèse et la différenciation fonctionnelle de l'intestin se font séquentiellement selon trois axes : (i) bien-sûr en fonction du temps, selon un axe développemental temporel (ii) en fonction de l'axe cranio-caudal ou proximo-distal, qui va du futur duodénum vers le futur côlon (iii) et finalement selon l'axe crypto-villositaire qui se définit de l'extérieur vers l'intérieur du tube intestinal, autrement dit de la séreuse vers la lumière.

Les données rapportées dans ce chapitre correspondent au développement intestinal chez la souris. Pour revues, voir (Montgomery et al., 1999;Roberts, 2000;Simon-Assmann et al., 2000;Gariépy, 2001;Taraviras et al., 1999;Natarajan et al., 2000;Duband, 2000;Simon-Assmann et al., 1993;Wiginton, 2000;Traber, 2000;Kedinger et al., 2000)

1. Selon l'axe crânio-caudal

Le développement du tractus digestif est initié lors de la gastrulation, par les repliements séquentiels de l'embryon en 2 points d'invagination qui vont constituer tout d'abord l'extrémité craniale puis l'extrémité caudale du tube gastro-intestinal. Le tube digestif primitif s'établit vers 5 jours de vie fœtale (E5) chez la souris. L'intestin dérive alors de la fusion de l'**endoderme**, qui formera l'épithélium du tractus digestif, et du **mésenchyme**, qui se différenciera en tissu conjonctif et en cellules musculaires (figure 5). L'endoderme intestinal, composé de cellules indifférenciées, est stratifié et creusé d'une petite lumière centrale. Sa morphologie est uniforme le long de l'axe cranio-caudal.

La structuration des villosités s'effectue progressivement selon une direction cranio-caudale à partir de E13 chez la souris (ce qui est tardif étant donné que le temps de gestation est d'environ 20 jours) et se poursuit jusqu'à 3 semaine après la naissance (P21). Au cours de la différenciation cellulaire, les cellules épithéliales acquièrent des capacités métaboliques et des profils d'expression génique spécifique à chaque futur segment de l'intestin, qui vont dicter la **régionalisation de l'intestin**. Ce sont en grande partie les **gènes homéotiques** qui régulent ce phénomène (voir § 4b).

2. Selon l'axe crypto-villositaire

Le premier signe de la morphogenèse crypto-villositaire, à E14, correspond à l'agrégation de cellules mésenchymateuses qui envoient des projections vers la lumière : les villosités émergent.

⇒ Différenciation de l'endoderme

L'endoderme reste indifférencié et stratifié jusqu'au 14^{ème} jour de vie fœtale. L'endoderme va ensuite se différencier en regard du mésenchyme qui lui est associé, selon une spécificité propre à

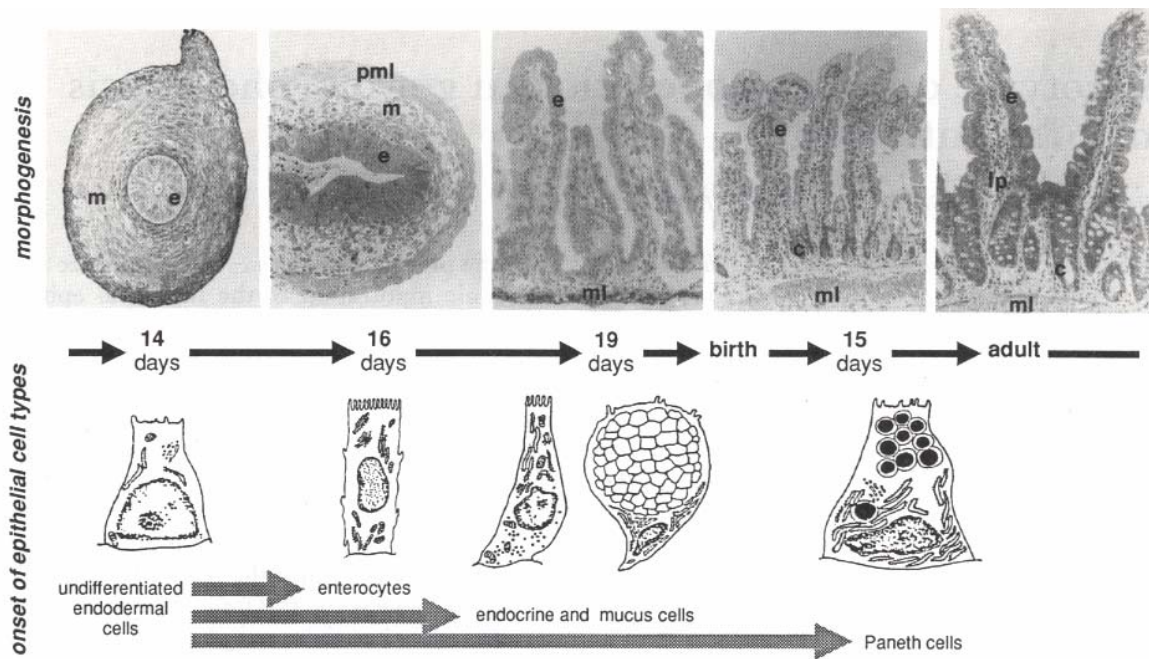


Figure 5 : Principales étapes de la morphogénèse de l'intestin murin et séquence d'apparition des différents types de cellules épithéliales intestinales (Simon-Assmann et al., 1993)
 e : endoderme, m : mésenchyme, lp : lamina propria, ml : muscle lisse.

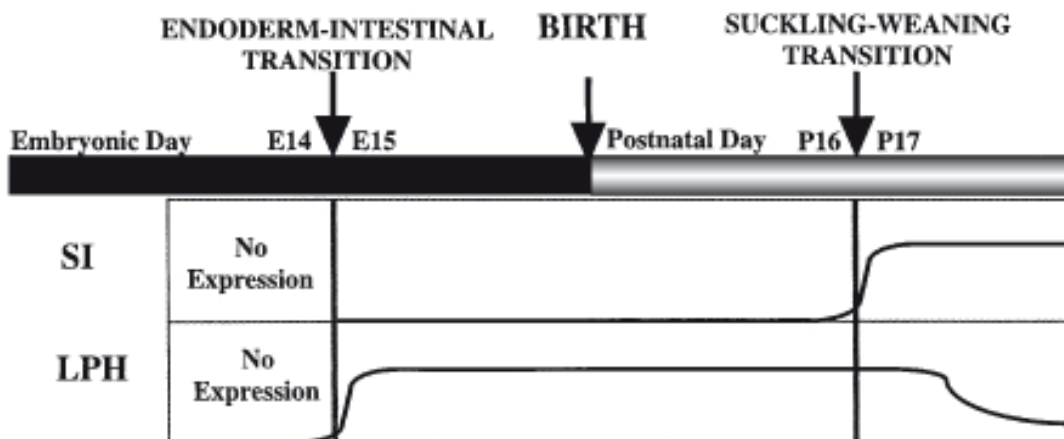


Figure 6 : Régulation de l'expression génique pendant le développement de l'intestin murin
 L'apparition d'enzymes digestives débute pendant la période prénatale dès le début de la formation des villosités et se poursuit après la naissance. L'intestin n'est totalement mature qu'après le sevrage. SI : saccharase-isomaltase, LPH : lactase-phlorizine hydrolase (Traber, 2000)

chaque région intestinale. Entre E15 et E19, l'endoderme stratifié est converti en **épithélium simple** où la **polarisation** des cellules s'établit donnant un **pôle apical** qui porte les enzymes digestives et des transporteurs, une membrane latérale avec des transporteurs et également des protéines de jonction intercellulaires, et un **pôle basal** qui porte des récepteurs pour les éléments de la **lame basale**. L'épithélium intervillósitaire reste encore stratifié et présente des cellules en mitose en abondance qui vont produire les cellules différenciées. Les cryptes se développent vers E19 parallèlement à la différenciation des cellules de Paneth. Les cryptes possèdent également des cellules souches et deviennent monoclonales, c'est à dire issues d'une seule cellule souche, vers P14. Les cellules souches des cryptes sont multipotentes et produisent des cellules dites intermédiaires qui donneront naissance aux différents types de cellules épithéliales de l'intestin, de façon chronologique: en premier lieu les entérocytes, puis les cellules à mucus, les cellules endocrines et finalement les cellules de Paneth (figure 5). La différenciation des différents types cellulaires est associée à l'apparition de marqueurs de différenciation qui leur sont spécifiques. Il s'agit notamment de l'expression des enzymes digestives, telles que la lactase-phlorizine hydrolase et la dipeptidylpeptidase IV (figure 6). La longueur des villosités, la profondeur des cryptes et le nombre de cellules épithéliales augmentent au cours du développement. Le nombre de cryptes augmente par des phénomènes de fissions verticales. La croissance s'accélère ainsi de P14 à P21. Trois semaines après la naissance, au moment du sevrage, a lieu un grand changement au niveau de l'expression génique dans l'épithélium intestinal qui se manifeste entre autre par l'apparition de la saccharase-isomaltase (figure 6). Et à 4 semaines de vie post-natale, l'épithélium intestinal a atteint son architecture et sa fonctionnalité matures.

⇒ Différenciation du mésenchyme

Parallèlement à l'épithélium, le mésenchyme commence à se différencier vers le 14^{ème} jour de vie foetale. Cette différenciation se fait également progressivement dans la direction cranio-caudale. Les cellules mésenchymateuses, qui jusque là étaient uniformes d'un point de vue morphologique, vont se séparer en deux groupes : (i) une partie de ces cellules va initier la formation des villosités en envoyant des projections vers la lumière afin de former la lamina propria, parallèlement à l'épithélium. Ces cellules mésenchymateuses vont donner naissance aux fibroblastes intramuqueux et notamment aux myofibroblastes péricryptaux, (ii) l'autre partie va former les muscles lisses intestinaux, à savoir la musculaire muqueuse et les couches musculaires situées entre la sous-muqueuse et la séreuse. Pour donner les cellules musculaires lisses, les cellules mésenchymateuses indifférenciées vont séquentiellement passer par différents stades phénotypiques : myoblastes, myocytes immatures puis myocytes matures. L'expression de gènes spécifiques du muscle lisse permet de suivre cette différenciation. Il s'agit par exemple de la desmine, de l' α - et de la γ -actine de muscle lisse, et de la protéine SM22.

3. Mise en place du système nerveux

Le système nerveux entérique dérive des cellules du segment vagal et du segment sacral de la crête neurale (pour revues, voir (Natarajan et al., 2000; Taraviras et al., 1999; Gariépy, 2001; Duband, 2000)). Les **cellules de la crête neurale** sont issues de la région de l'embryon à la frontière entre l'ectoderme et le tube neural. Ces cellules se dissocient du tube neural par une transition épithélio-mésenchymateuse. Elles migrent ensuite selon des trajets parfaitement définis occupant toujours des matrices extracellulaires constituées notamment d'un réseau de fibres de collagène et de fibronectine. Elles ont le potentiel de créer une grande diversité cellulaire : **neurones, cellules gliales et cellules de Schwann** du système nerveux périphérique, cellules pigmentaires, endocrines, conjonctives, cartilagineuses, osseuses ou musculaires de la tête.

Les cellules du segment vagal migrent dans une direction cranio-caudale afin de coloniser l'ensemble du tractus digestif. La majorité des cellules dérivées du segment sacral se retrouve dans la région colorectale. Le récepteur tyrosine-kinase **Ret** est important dans ces phénomènes

de migration et dans le développement consécutif des neuroblastes de l'intestin. Ret et son co-récepteur **Gfr α 1** sont exprimés par les cellules dérivées des régions vagale et sacrale de la crête neurale déjà durant leur migration vers l'intestin. Son ligand **Gdnf** (glial cell line-derived neurotrophic factor) est exprimé par les cellules mésenchymateuses de l'intestin en développement. L'absence de signalisation Ret/Gfr α 1/Gdnf empêche le développement du système nerveux entérique. Les souris invalidées pour Ret, Gfr α 1 ou Gdnf présentent une **aganglionose** intestinale sévère caractérisée par l'absence de ganglions entériques dans l'intestin. Ces souris ont également des anomalies rénales et meurent peu après la naissance. Le facteur de transcription **Sox10** est également exprimé par les cellules précurseurs du système nerveux entérique et est essentiel à son développement. Les souris homozygotes mutantes pour Sox10 présentent en effet une aganglionose intestinale totale et meurent durant l'embryogenèse. La voie de signalisation de l'**endotheline-3** et de son récepteur **EDNRB** est tout aussi importante. EDNRB est exprimé dans les cellules de la crête neurale en migration et, après colonisation du tube digestif, par les cellules mésenchymateuses intestinales. L'endotheline-3 et l'« endothelin-converting enzyme » **ece1**, qui lui confère sa forme mature, sont exprimées dans le mésenchyme intestinal. Les souris délétées pour l'endothéline-3, pour EDNRB ou pour ece1 présentent dans les trois cas une aganglionose distale.

Des mutations des gènes RET, Sox10, EDNRB, ece1 ou de l'endothéline-3 ont été trouvées chez des patients atteints de la **maladie de Hirschprung**, mégacolon congénital caractérisé par une absence segmentaire de cellules ganglionnaires parasympathiques des plexus de Meissner et d'Auerbach.

4. Régulation moléculaire de la morphogenèse intestinale

a) Régulation extrinsèque

De multiples facteurs extrinsèques participent à la régulation du développement du tractus gastro-intestinal. Les cellules du système digestif sont en effet exposées aux facteurs présents dans la circulation sanguine fœtale, le liquide amniotique et, après la naissance, aux facteurs présents dans le lait maternel. Les quantités de ces facteurs varient au cours du développement ce qui suggère leur influence régulatrice. Il s'agit, par exemple, des facteurs **EGF** (epidermal growth factor), **TGF- α** (transforming growth factor α) et **TGF- β** . L'EGF est présent dans le liquide amniotique, dans le lait maternel et dans de nombreux tissus fœtaux. Le TGF- α est synthétisé par les entérocytes. Ils sont tous les deux capables de lier et d'activer le récepteur à l'EGF. Il a été montré que le traitement d'explants d'intestin fœtal avec de l'EGF accélérerait la maturation du tissu. Il doit exister également des mécanismes inhibiteurs qui dictent la croissance de l'intestin de façon à ce qu'elle corresponde à des paramètres étroits. Par exemple, les souris qui surexpriment le TGF- α présentent une augmentation de la taille de nombreux tissus et notamment une augmentation de 2 fois de la masse épithéliale intestinale (Sandgren et al., 1990). Les souris invalidées pour le TGF- α ne présentent par contre aucune anomalie au niveau intestinal (Luetke et al., 1993). Le TGF- β semble lui être impliqué dans la mise en place de l'assymétrie du tractus digestif. Il a également été montré, chez l'humain, qu'il est régulateur de la prolifération des entérocytes et de la synthèse de collagène par les cellules musculaires dans l'intestin fœtal. Les **glucocorticoïdes** (GC) semblent également avoir un rôle important dans le développement intestinal car une augmentation importante de la concentration de corticostérone a lieu juste avant l'apparition des enzymes digestives précédant le sevrage. De plus, l'administration de glucocorticoïdes exogènes peu après la naissance induit une maturation précoce de l'épithélium intestinal (Henning, 1987).

b) Régulation intrinsèque

Des régulations moléculaires intrinsèques complexes sont également essentielles au développement du tractus digestif. La formation de l'intestin s'initie lors de la gastrulation. La **mise en place de l'endoderme définitif** requiert principalement l'expression des facteurs de

transcription **Nodal**, ligand de la famille du TGF- β (Lowe et al., 2001), et **Sox17** (Kanai-Azuma et al., 2002), et de la voie **Wnt**. Les **facteurs de transcription homéotiques Hox** jouent un rôle primordial en régulant la régionalisation du cerveau et du squelette mais également celle du tractus digestif. En effet, des différences régionales d'expression des gènes à homéoboîte ont été largement démontrées dans l'intestin de poulet (figure 7) et chez la souris. Ces spécificités d'expression pourraient être à l'origine de la démarcation des différentes régions de l'intestin et leur séparation par des sphincters. Les souris invalidées pour les gènes *Hoxd-12* et *Hoxd-13* présentent des défauts de la musculature anale associées à un prolapse et à un sphincter anal mal développé (Kondo et al., 1996). Les souris doublement invalidées pour *Hoxa-13* et *Hoxd-13* présentent des défauts musculaires sévères au niveau du sphincter anal responsables d'une absence d'ouverture de l'anus (Warot et al., 1997). D'autres gènes homéotiques sont spécifiquement exprimés dans l'intestin. Il s'agit des gènes **Cdx1** et **Cdx2**, exprimés précocement dans l'endoderme intestinal. Les protéines Cdx1 et Cdx2 montrent ensuite une complémentarité d'expression puisque la première est exprimée par les cellules des cryptes et la seconde essentiellement par les cellules des villosités. L'induction d'une surexpression de Cdx2 dans des cellules intestinales stimule leur différenciation en induisant par exemple l'activité transcriptionnelle du promoteur de la saccharase-isomaltase, marqueur de la différenciation épithéliale intestinale. Cdx2 stimule également l'expression de molécules d'adhésion telle que la sous-unité $\beta 4$ d'intégrine et de molécules de la matrice extracellulaire.

De façon générale, d'autres facteurs de transcription, soit ubiquitaires, soit spécifiquement exprimés dans l'intestin, vont réguler les processus cellulaires nécessaires au développement de l'intestin. Par exemple, lorsque le gène *N-myc*, médiateur clé de la prolifération, est invalidé chez la souris, le développement intestinal est défectueux. *HNF3 β* , initialement identifié comme étant spécifiquement exprimé dans le foie, est également essentiel à la différenciation du tractus gastro-intestinal. Outre ces exemples, nous aborderons la régulation par d'autres facteurs, notamment **HNF4**, **E2F** et **c-Myc**, dans la partie 6 des « Résultats ».

c) Importance des interactions épithélio-mésenchymateuses (figure 8)

Un contact étroit entre les cellules épithéliales et celles d'origine mésenchymateuse permettant la mise en place d'interactions épithélio-mésenchymateuses est également nécessaire à la **morphogenèse** et à la **cytodifférenciation** de l'intestin. En effet, une culture primaire ou une greffe d'endoderme intestinal ne peut survivre ou se différencier sans la coculture de tissus mésenchymateux. Des expériences de dissociation et de réassociation d'endoderme et de mésenchyme provenant de 2 niveaux distincts de l'intestin ont révélé l'effet inducteur ou permissif de chacune des 2 ébauches sur la différenciation de l'autre ébauche. Ainsi, par exemple, l'endoderme gastrique ou colique peut se différencier en un épithélium caractéristique de l'intestin grêle sous l'influence de mésenchyme d'intestin grêle. La réciprocité existe. L'induction semble se faire d'une part via des **molécules solubles** dont l'expression est contrôlée par des facteurs de transcription, et d'autre part via les **molécules de la matrice extracellulaire** qui constituent la **lame basale**, située à l'interface entre l'épithélium et le mésenchyme, interagissant avec des récepteurs membranaires et servant peut-être de réservoir pour des facteurs de croissance solubles (figure 8).

La protéine **Sonic Hedgehog** (Shh), homologue chez les vertébrés de la protéine Hedgehog (hh) de la drosophile, semble être un des médiateurs solubles des interactions épithélio-mésenchymateuses dans l'intestin proximal. Shh est exprimé spécifiquement par l'endoderme intestinal. Les souris invalidées pour Shh présentent des anomalies de formation de la partie proximale du tube digestif associées notamment à une absence ou du moins à une désorganisation du mésenchyme. Ceci suggère que Shh agirait comme un signal provenant de **l'endoderme vers le mésenchyme**. De plus Shh induit l'expression de son récepteur Patched présent uniquement au niveau mésenchymateux. L'expression de Shh dans l'intestin est régulée par le facteur de transcription **HNF-3 β** . Shh est capable de réguler l'expression des molécules de signalisation **BMP** (bone morphogenetic proteins), membres de la superfamille du TGF- β , précisément *Bmp-2* et *-4* dans l'intestin. Cette signalisation Shh/Bmp semble jouer un rôle dans le **déterminisme**

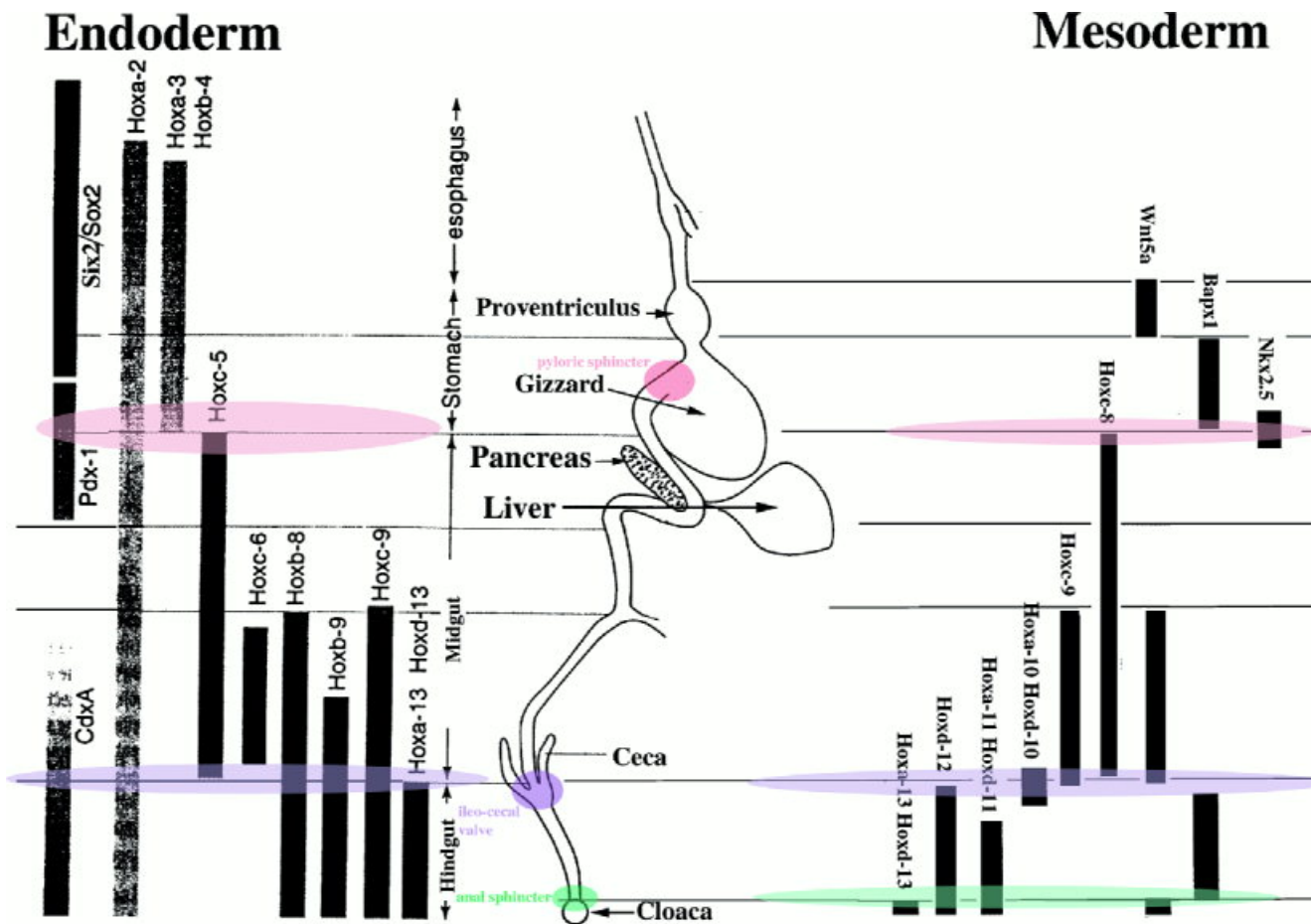


Figure 7 : Expression de gènes homéotiques, facteurs de transcription ou facteurs sécrétés impliqués dans la régionalisation de l'intestin de poulet (Adapté de (Grapin-Botton et al., 2000))

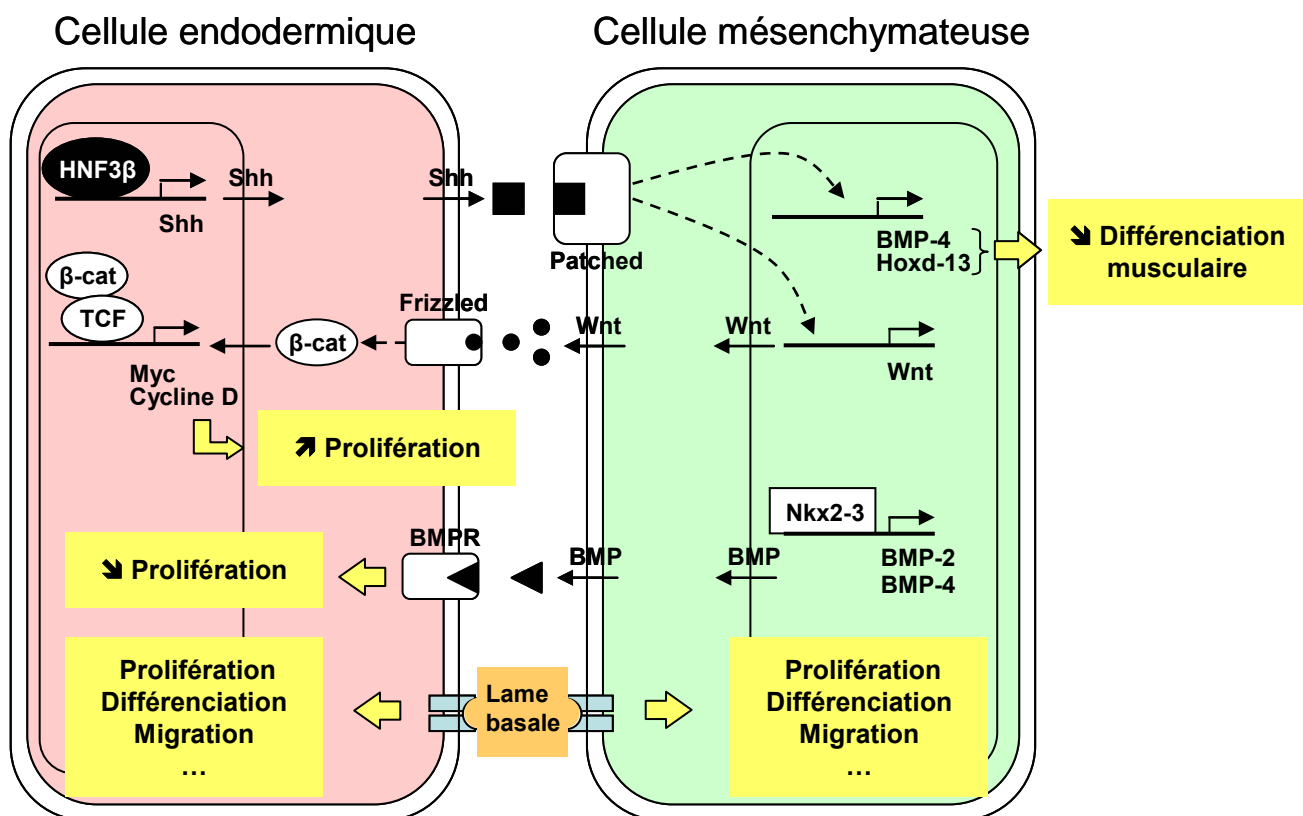


Figure 8 : Illustration schématique des interactions épithélio-mésenchymateuses (Adapté de (Simon-Assmann et al., 2000))

Les conséquences cellulaires sont indiquées dans les encarts jaunes.

régional de l'intestin. Bmp-4 régule également négativement la **différenciation du muscle** lisse intestinal. En effet, lorsque Bmp-4 est surexprimé de façon ectopique, on retrouve un amincissement des couches musculaires. Shh peut également induire l'expression des gènes **Hox**, notamment Hoxd-13, également impliqué dans la différenciation du muscle lisse intestinal. Par ailleurs, Shh stimule l'expression, par les cellules **mésenchymateuses**, du facteur sécrété **Wnt**.

Wnt agit à son tour au niveau des cellules **épithéliales** où il active son récepteur Frizzled permettant au final la translocation nucléaire du complexe β -caténine/TCF/LEF qui active la transcription de gènes impliqués notamment dans la prolifération.

Par ailleurs, 3 facteurs de transcription exprimés spécifiquement dans le **mésenchyme** et influençant les cellules **épithéliales** ont été mis en évidence grâce à leur invalidation chez la souris. Il s'agit des gènes **Hlx**, **Fkh-6** et **Nkx2-3**. Les souris invalidées pour Hlx présentent un défaut de croissance de l'intestin. Celles invalidées pour Fkh-6 présentent une prolifération anormale des cellules épithéliales et une chute d'expression de Bmp-2 et -4. L'invalidation du gène Nkx2-3 entraîne les mêmes anomalies, accompagnées d'une morphologie anormale de l'intestin. Ainsi Fkh-6 et Nkx2-3 exprimés par les cellules **mésenchymateuses** semblent contrôler négativement la prolifération **épithéliale** par le biais de ces facteurs sécrétés.

Outre l'importance des molécules précitées, les **molécules de la lame basale** jouent un rôle essentiel dans les interactions épithélio-mésenchymateuses. Se situant à l'interface entre l'épithélium et le mésenchyme intestinal, les molécules de la lame basale peuvent interagir avec des récepteurs de part et d'autre et transmettre ainsi directement les signaux qui en émanent.

II. Les laminines, éléments clé des lames basales

A. Généralités sur la lame basale

La lame basale est un feuillet spécialisé de matrice extracellulaire qui est localisé à la base de tous les épithéliums et endothéliums, et entoure la plupart des cellules musculaires, adipeuses et nerveuses [pour revues, voir (Simon-Assmann et al., 2000; Erickson et al., 2000; Colognato et al., 2000; Li et al., 2003b)]. Alors que la matrice extracellulaire interstitielle environne les cellules du tissu conjonctif, la lame basale est **structurée** et **sépare** les épithéliums et autres tissus du compartiment stromal. Cette structure à forte densité électronique peut être visualisée sous forme d'un feuillet continu de 50 à 100 nm d'épaisseur. Les lames basales sont des structures tridimensionnelles composées principalement d'un réseau de collagène de type IV, de nidogène, de perlecan et de laminines (figure 9). Ces molécules sont sécrétées par les cellules environnantes et s'organisent en lame basale selon des interactions moléculaires bien précises : tout d'abord, des réseaux de polymères de collagène IV et de laminine se forment de façon indépendante, puis sont interconnectés essentiellement par des molécules de nidogène et de perlecan. Le réseau de collagène IV confère à la lame basale une stabilité mécanique et celui de laminine, du fait de ses liaisons non covalentes lui apporterait plutôt une flexibilité dynamique. Les familles de molécules de laminine et de collagène IV présentent de nombreuses isoformes qui font la **variété des lames basales**. Les **laminines** sont des glycoprotéines composées de 3 chaînes α , β et γ reliées par des ponts disulfures. 5 chaînes α ($\alpha 1$ à $\alpha 5$), 3 chaînes β ($\beta 1$ à $\beta 3$) et 3 chaînes γ ($\gamma 1$ à $\gamma 3$) ont été identifiées à ce jour et permettent la formation de 16 isoformes de laminines. Le **collagène IV** est lui formé par l'enroulement en hélice de 3 chaînes α polypeptidiques. 6 chaînes α différentes ont été décrites ($\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$). L'isoforme ($\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$) est la plus répandue au sein des lames basales. Le **nidogène** est une glycoprotéine sulfatée qui relie le réseau de laminine à celui de collagène IV et qui forme également un complexe ternaire avec les laminines et le perlecan. Le **perlecan** est un protéoglycane constitué d'une protéine comportant 3 chaînes d'héparane sulfate latérales. Il lie le nidogène et le collagène IV par son core protéique et les laminines via ses chaînes de glycosaminoglycanes, participant ainsi à la stabilisation du réseau tridimensionnel.

La composition des lames basales varie selon leur localisation anatomique et le stade de développement de l'organisme et confère aux cellules un **micro-environnement bien spécifique**. Outre son **rôle structural** de compartimentalisation et de maintien de la cohésion cellulaire, les lames basales ont un **rôle physiologique** largement démontré. En effet, l'interaction des cellules avec ce microenvironnement très structuré est essentielle à de nombreux processus biologiques tels que la croissance, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires, phénomènes primordiaux au cours de l'organogenèse, dans l'homéostasie tissulaire et dont les dérèglements peuvent avoir une grande importance dans l'émergence de pathologies. Les molécules de la lame basale sont en effet susceptibles de moduler le phénotype et le devenir des cellules par leurs interactions avec des récepteurs membranaires de type intégrine mais aussi non-intégrine (dystroglycan, Luthéran...), pouvant agir sur l'organisation du cytosquelette et induire diverses voies de signalisation intracellulaires. La diversité des réponses cellulaires est donc fonction de l'hétérogénéité des lames basales et des récepteurs mis en jeu.

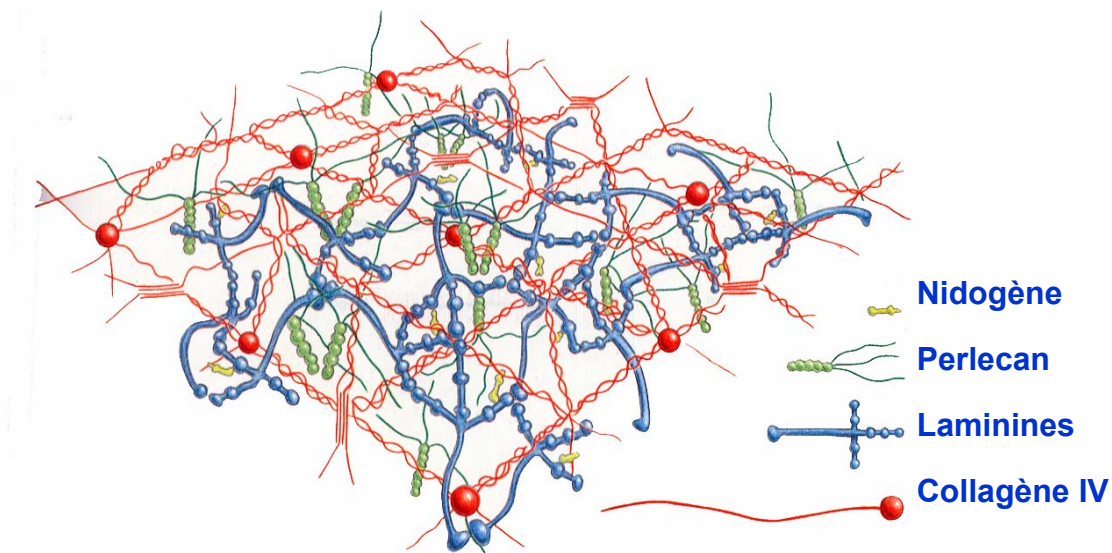


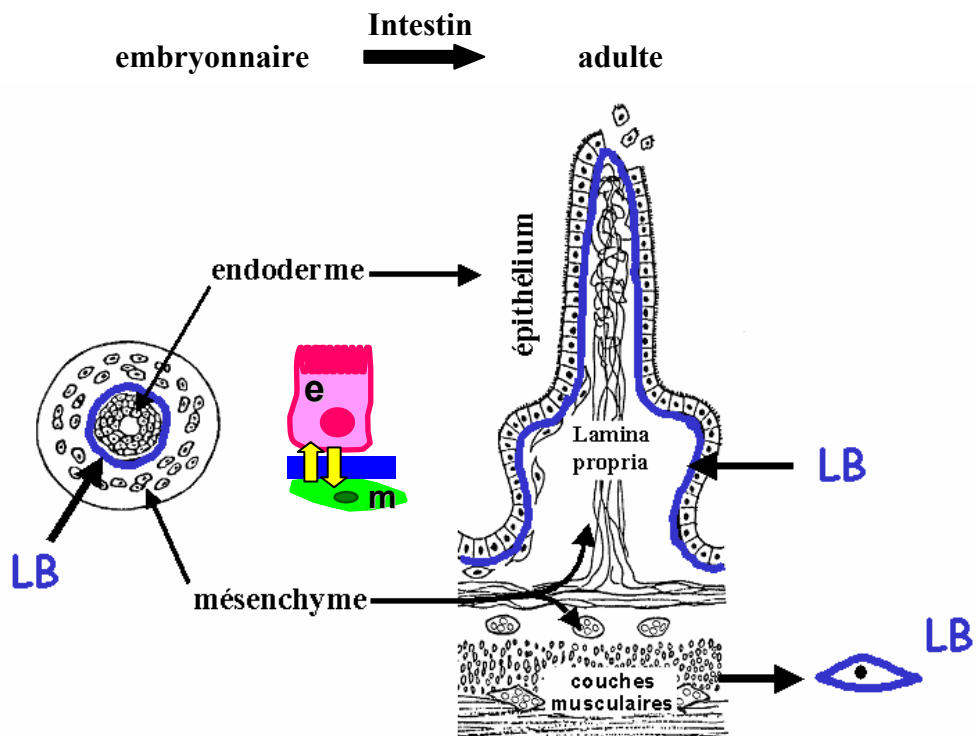
Figure 9 : Représentation tri-dimensionnelle de la lame basale (Cognato et al., 2000)

B. Les lames basales intestinales

Dans l'intestin mature, les lames basales sont localisées à deux niveaux: (i) sous l'épithélium, où la lame basale sépare l'épithélium intestinal du tissu conjonctif sous-jacent (ii) au niveau du muscle lisse intestinal, où la lame basale entoure chaque cellule musculaire (figure 10). Les lames basales intestinales, en dirigeant les interactions épithélio-mésenchymateuses, semblent jouer un rôle important dans la morphogenèse de l'organe, mais aussi dans le maintien, chez l'adulte, d'un microenvironnement nécessaire aux multiples fonctions des cellules intestinales [pour revue, voir (Simon-Assmann et al., 1993; Simon-Assmann et al., 2000)].

Alors que la lame basale sous-épithéliale est déjà présente dans l'intestin de souris au stade fœtal de 12 jours à l'interface entre l'endoderme et le mésenchyme, celle entourant les cellules musculaires apparaît en parallèle de la différenciation du mésenchyme, vers 14 jours de vie fœtale. Plusieurs études réalisées en co-cultures (qui reproduisent *in vitro* les interactions

épithélio-mésenchymateuses existant *in vivo*) ont montré une relation entre l'établissement d'une lame basale et la différenciation. En effet, la sécrétion et l'organisation des molécules de la lame basale précèdent toujours l'expression des marqueurs de différenciation épithéliale. La lame basale semble ensuite avoir un effet permissif sur la différenciation de l'épithélium intestinal. L'adhésion des cellules à la lame basale est requise pour l'acquisition de leur polarité qui est elle nécessaire à l'expression génique gouvernant la différenciation. Des études *in vitro* ont notamment révélé que la laminine-111 ($\alpha1\beta1\gamma1$) induit la différenciation des cellules Caco-2 et la synthèse de saccharase-isomaltase (Vachon et al., 1995;Turck et al., 2005). L'utilisation du modèle d'intestin hybride (association d'endoderme et de mésenchyme d'espèces différentes) associée à des marquages immunohistologiques a permis de déterminer l'**origine cellulaire** des éléments de la lame basale (Simon-Assmann et al., 1993). Ainsi il a pu être défini que la lame basale sous-épithéliale intestinale comprend des molécules sécrétées soit par les cellules endodermiques soit par les cellules mésenchymateuses ou conjointement par les deux compartiments cellulaires et ceci avec une chronologie développementale bien précise (figure 10).



Origine :	endoderme	mésenchyme	→	épithélium	fibroblastes
$\alpha1$	+	0		+	+
$\alpha2$	0	+		0	+
$\gamma2$	+	0		0	+
$\alpha5$	++	+		+	++
Collagène IV	+/-	+		0	+
Nidogène	0	+		0	+
Perlecan	+	0		+	0

Figure 10 : Les lames basales dans l'intestin embryonnaire et adulte

La composition des lames basales et l'origine des molécules constitutives sont indiquées dans le tableau.

C. Les laminines

1. Structure

Les laminines, composants majeurs des lames basales, sont des glycoprotéines hétérotrimériques. Les 3 types de chaînes (α , β , et γ) qui les composent, codées par des gènes distincts, présentent une **expression tissu-spécifique propre** et une **distribution spatio-temporelle spécifique**, leur conférant des rôles **distincts** (Tunggal et al., 2000).

Les laminines sont des molécules de haut poids moléculaire (entre 500 et 1000kDa) et présentent une structure de base en forme de croix avec 3 bras courts et un bras long. Les bras courts sont formés par les parties NH₂-terminales des 3 chaînes, les parties COOH-terminales étant associées en triple hélice et formant le bras long, qui se termine par une structure globulaire nommée domaine G et porté par la chaîne α (figure 11). Une nouvelle nomenclature a été récemment adoptée. Les différentes isoformes de laminines se sont vu attribuer un numéro à trois chiffres reflétant leur composition en chaînes α , β , et γ . (Aumailley et al., 2005).

a) Domaine G

Le domaine G, constituant la partie COOH-terminale de la **chaîne α** , se subdivise en **5 sous-domaines LG1 à LG5**. Bien qu'ils comportent un tiers des acides aminés (900 résidus) composant la chaîne α , ils présentent une structure globulaire très compactée en feuillet β de 14 brins antiparallèles disposés en 2 couches.

b) Domaines I et II

Ils représentent la plus grande portion de la protéine et correspondent à la région de connexion des 3 chaînes α , β et γ , associées en **triple hélice**. Chaque hélice α comprend 600 acides aminés disposés en répétition d'heptamères (abcdefg)_n où a et d sont des acides aminés hydrophobes, e et g des acides aminés chargés et c et f de résidus hydrophiles. Les hélices sont reliées entre elles par des ponts disulfures qui assurent au trimère une **grande stabilité**. La chaîne β présente la particularité de posséder un domaine B qui sépare les domaines I et II. Ce domaine supplémentaire est relativement petit (35 acides aminés) et riche en glycine et en cystéine.

c) Domaines III et V

Ces domaines sont localisés au niveau des bras courts et présentent des séries de 3 à 8 modules nommés **LE** (EGF like), **de type EGF** mais comprenant 2 résidus cystéines supplémentaires.

d) Domaines IV

Ce sont des domaines **globulaires** qui séparent les domaines III et V. La chaîne α en contient 2 : IVa et IVb.

e) Domaines VI

Ils constituent les domaines terminaux des bras courts des laminines. Il s'agit de domaines **globulaires** possédant un motif WWQS très conservé entre les espèces et suivi d'une séquence riche en cystéine. Ces domaines sont indispensables à **l'auto-assemblage des laminines** en réseau (d'où leur seconde dénomination en domaines LN). La perte de ce domaine empêche en effet l'intégration de la molécule au sein de la lame basale.

Nous avons vu précédemment que la famille des laminines comptait 16 isoformes (figure 12A). Certaines d'entre elles diffèrent de cette morphologie classique et présentent quelques particularités structurales (figure 12B). Les chaînes α 3A et α 4 sont tronquées au niveau NH₂-terminal et contiennent seulement 2 ou 3 modules LE. La chaîne β 3 contient 6 modules LE, pas de domaines IV, mais le domaine terminal VI est présent. La chaîne γ 2 contient 6 modules LE, 1 domaine IV mais pas de domaine VI. L'association de chaînes longues entre elles, de chaînes longues et de chaînes tronquées et de chaînes tronquées exclusivement donne au final 3

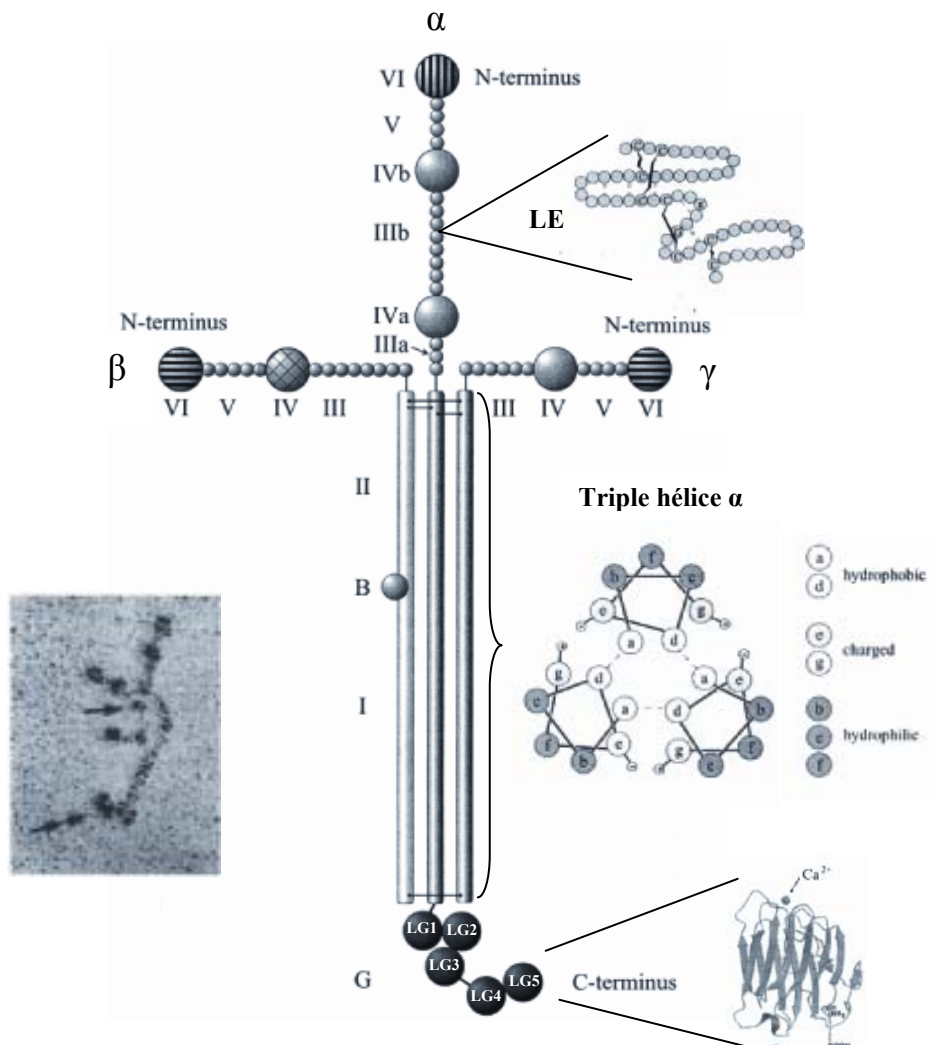


Figure 11 : Représentation de la structure d'une molécule de laminine.

Les lignes horizontales représentent des ponts disulfures.

L'image de gauche correspond à une molécule de laminine-111 vue en microscopie électronique. La flèche simple indique le domaine IVa et la double flèche le domaine G (Adapté de Tunggal et al., 2000).

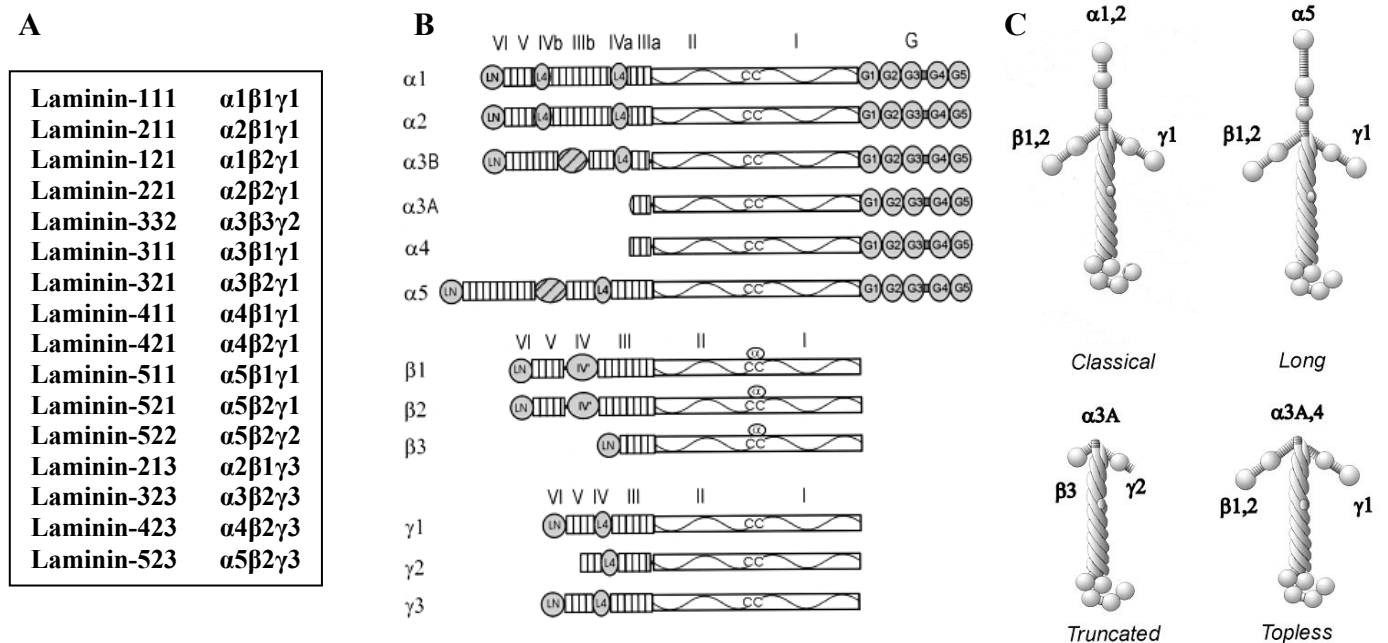


Figure 12 : Composition et caractéristiques des différentes isoformes de laminine

(A) Les différentes isoformes de laminine et leur composition en chaîne

(B) Représentation des motifs structuraux des différentes chaînes de laminine (Colognato et Yurchenco, 2000)

(C) Les différentes morphologies des laminines (Colognato et Yurchenco, 2000)

Sous-unité de laminine	Distribution tissulaire	Phénotype des souris dont le gène a été invalidé ou muté	Gène	Pathologie humaine congénitale
$\alpha 1$	Embryon précoce, placenta, glomérules et tubules rénaux, glandes mammaires et salivaires, ovaires, utérus, testicules, rétine, intestin, foie, poumons, pancréas	Létalité embryonnaire précoce	LAMA1	Non décrite
$\alpha 2$	Muscles squelettiques et cardiaque, nerfs périphériques, trophoblaste, intestin, cerveau	Létalité à 5 semaines de vie post-natale (souris dy/dy). Retard de croissance, dystrophies musculaires sévères (souris dy2J/dy2J)	LAMA2	Dystrophie musculaire congénitale
$\alpha 3$	Peau et plupart des épithélia	Létalité vers 2-3 jours de vie post-natale. Décollement de l'épiderme	LAMA3	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\alpha 4$	Muscles squelettiques fœtaux, muscles lisses des viscères, endothélium des vaisseaux sanguins, moelle osseuse	Développement normal ; souris fertiles. Altérations au niveau des jonctions neuromusculaires, mouvements non coordonnés	LAMA4	Non décrite
$\alpha 5$	Epithelia divers, reins, poumons, vaisseaux sanguins, moelle osseuse, muscles et nerfs en formation, lame basale au niveau des synapses	Létalité embryonnaire (vers 13,5-16,5 jours). Développement placentaire altéré, défauts développementaux des poumons, des reins, de l'intestin et exencéphalie	LAMA5	Non décrite
$\beta 1$	Ubiquitaire	Létalité embryonnaire précoce (jour 5,5). Absence complète des lames basales.	LAMB1	Non décrite
$\beta 2$	Jonction neuromusculaire, glomérules rénaux, vaisseaux sanguins	Létalité post-natale. Défauts de l'ultrafiltration rénale (albuminurie) et anomalies au niveau des jonctions neuromusculaires	LAMB2	Syndrome de Pierson
$\beta 3$	Peau et plupart des épithélia	NF	LAMB3	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 1$	Ubiquitaire	Létalité embryonnaire précoce (avant jour 5,5). Absence complète de lames basales	LAMC1	Non décrite
$\gamma 2$	Peau et plupart des épithélia	Létalité à 5 jours de vie post-natale. Décollement de l'épiderme	LAMC2	Epidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 3$	Reins, poumons, appareil génital, nerfs, cerveau, rétine	NF	LAMC3	Non décrite

Tableau I : Distribution tissulaire des sous-unités de laminine, phénotype associé à leur invalidation génique chez la souris et pathologies humaines associées à leur mutation

possibilités de forme aux isoformes de laminines (figure 12C). Cette diversité est augmentée par le fait qu'il existe des épissages alternatifs pour certaines chaînes et que d'autres vont subir un clivage post-traductionnel extracellulaire.

2. Expression tissulaire et implications physiologiques et pathologiques

L'expression des laminines est tissu-spécifique et varie également de façon spatio-temporelle. La **chaîne $\alpha 1$** est exprimée à des **stades embryonnaires précoces** mais présente une expression très limitée dans les tissus adultes. La **chaîne $\alpha 5$** est la chaîne α la plus **ubiquitaire**. Elle est présente lors du **développement embryonnaire** et est également **fortement exprimée chez l'adulte** dans la plupart des lames basales, qu'elles soient épithéliales ou musculaires. Les **chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$** sont en général abondantes dans les tissus d'origine mésodermique (muscle cardiaque, squelettique ou lisse). Les **chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$** sont ubiquitaires. Les **chaînes $\alpha 3$, $\beta 2$ et $\gamma 2$** formant la laminine-332 sont typiques des lames basales sous-jacentes aux épithélia squameux et stratifiés tels ceux de la peau ou de l'œsophage [pour revues, voir (Paez et al., 2007; Miner, 2008; Colognato et al., 2000; Bolcato-Bellemin et al., 2004)].

La fonction des laminines a pu être définie dans certains cas par des expériences de transgénèse chez la souris. La distribution tissulaire et les phénotypes résultant d'inactivation de gènes sont décrits dans le tableau I. On peut noter que la délétion de chaînes de laminine entraîne une **léthalité** dans la majorité des cas.

De plus, certains modèles animaux reproduisent des **pathologies humaines congénitales** relatives à des mutations génétiques de certaines chaînes de laminines. Par exemple, une mutation des gènes LAMA3, LAMB3 et LAMC2 codant respectivement pour les chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ constitutives de la laminine-332, entraîne une épidermolyse bulleuse jonctionnelle (anomalie de l'adhérence des kératinocytes). Un autre exemple est celui de dystrophie musculaire congénitale consécutive à la mutation du gène LAMA2 codant pour la chaîne $\alpha 2$ et caractérisée par des anomalies sévères des lames basales des muscles striés et des nerfs périphériques.

Les spécificités d'expression spatio-temporelles des laminines, les différents phénotypes qu'engendre leur délétion chez la souris, et les différentes pathologies humaines congénitales associées à leur mutation génique démontrent que les isoformes de laminines ont des **fonctions physiologiques distinctes**.

3. Les laminines dans l'intestin

5 chaînes α , 3 chaînes β et 2 chaînes γ sont présentes au sein des lames basales intestinales [Pour revues, voir Simon-Assmann et al., 1998, Simon-Assmann et al., 2003, Teller et Beaulieu, 2001, Kedinger et al., 2000]. La co-localisation de certaines chaînes a permis de présumer la présence de plusieurs isoformes de laminines dans l'intestin même si leur association trimérique reste à définir biochimiquement: il s'agit des laminines -111, -121, -211, -221, -311, -332, -411, -421, -511, -521 et -522 (figure 13).

a) Laminine-111 et -121:

Chez la souris, les chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont exprimées dès E12 lors du développement intestinal au niveau de la lame basale délimitant l'endoderme. La chaîne $\beta 2$ est exprimée plus tardivement, suggérant un rôle de la laminine-111 et non de la laminine-121 dans le **développement embryonnaire**. Dans l'organe **mature**, les expressions des chaînes $\alpha 1$ et $\beta 2$ sont limitées au compartiment des cryptes alors que les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont exprimées tout le long de l'axe crypto-villositaire. Il semble donc y avoir une colocalisation des laminines-111 et -121, restreinte au **compartiment prolifératif**.

Des expériences *in vitro* de culture cellulaire ont révélé que la laminine-111 est impliquée dans le **différenciation** des cellules épithéliales intestinales. L'ajout d'anticorps anti-laminine-111 dans le milieu de culture de cocultures d'endoderme et de fibroblastes inhibe l'apparition de l'expression de lactase (Simo et al., 1992). De plus, la culture de cellules épithéliales intestinales

Caco2 sur laminine-111 engendre une augmentation de l'expression du gène Cdx2 très impliqué dans la différenciation cellulaire intestinale (Lorentz et al., 1997). L'inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans des cellules Caco2 par une stratégie d'ARN antisens provoque des altérations de leur polarité associée à des microvillosités sous-développées et à une absence d'expression de lactase (De Arcangelis et al., 1996). Par ailleurs, les glucocorticoïdes et l'acide rétinoïque, agents connus pour stimuler la différenciation intestinale, sont capables d'induire l'expression de la laminine-111 dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses intestinales (Kedinger et al., 1998). Cependant, la transfection de cellules HT-29 déficientes en chaîne $\alpha 1$ avec l'ADNc de la chaîne $\alpha 1$ n'induit pas leur différenciation et lorsque ces cellules sont greffées sous la peau de souris nude, les tumeurs résultantes exprimant la chaîne $\alpha 1$ ont un volume largement supérieur aux tumeurs contrôles qui ne l'expriment pas (De Arcangelis et al., 2001). De plus, la localisation de la laminine-111 dans le compartiment des cryptes appuie son potentiel rôle dans la prolifération. La laminine-111 présente donc un rôle **ambivalent** entre la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin.

b) Laminine-211 et -221 :

La chaîne $\alpha 2$ apparaît peu avant la naissance et est principalement présente dans la lame basale qui souligne le **fond des cryptes** et faiblement dans le **tissu mésenchymateux**, au niveau de la séreuse et autour des plexus entériques d'Auerbach et Meissner (Lefebvre et al., 1999). Cela pourrait indiquer un rôle des laminines-211 ou -221 dans la prolifération des cellules des cryptes, dans la différenciation des cellules de Paneth et/ou dans la maintenance du lignage des cellules souches. Les souris délétées pour la chaîne $\alpha 2$ ne présentent pourtant ni altération du compartiment des cryptes, ni de la différenciation des cellules intestinales (Simon-Assmann et al., 1994). Peut-être est-ce dû à un phénomène de compensation par la présence des laminines-111 et -121. Néanmoins, les cellules cancéreuses coliques Caco2 cultivées sur une matrice de laminine-211 présentent un haut degré de différenciation avec la sur-expression de 2 enzymes de la bordure en brosse : l'aminopeptidase et la phosphatase alcaline. Cependant d'autres enzymes caractéristiques de la différenciation des entérocytes telles que la lactase ou la saccharase-isomaltase sont inchangées (Vachon et al., 1995).

c) Laminine-311 et -332 :

Au niveau de la lame basale **sous-épithéliale**, leur patron d'expression est similaire à celui de la laminine-511 pendant le **développement** et dans l'intestin **mature**. D'un point de vue fonctionnel, il est bien connu que la laminine-332 forme les points d'ancrage des hémidesmosomes de type I au niveau de l'épithélium de la peau. Au niveau de l'épithélium intestinal, on ne retrouve pas d'hémidesmosome de type I. Cependant, les cellules humaines cancéreuses coliques HT-29 présentent des plaques cytoplasmiques au niveau basal composées de molécules retrouvées dans les hémidesmosomes classiques telles que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, la protéine HD1 et la laminine-332, mais ne présentent pas de protéine BPAG. Ces structures ont été définies comme des **hémidesmosomes de type II**. Ces éléments sont également colocalisés au niveau du pôle basal des cellules épithéliales villositaires. Le fait que des hémidesmosomes soient localisés au niveau villositaire, où a lieu la migration des cellules épithéliales vers le sommet des villosités, suggère que les éléments qui les composent, notamment la laminine-332, pourraient jouer un rôle dans la **migration** et/ou la différenciation cellulaire plutôt qu'un rôle dans l'ancrage des cellules comme c'est le cas dans la peau. Aucune corrélation entre l'état de différenciation des cellules intestinales en culture et l'expression de la laminine-332 n'a pu être établie. Par contre, des expériences *in vitro* de réparation de blessure ont été effectuées avec des cellules cancéreuses coliques humaines T84. La réparation de la blessure est bloquée par l'ajout d'un anticorps dirigé contre la chaîne $\alpha 3$ de laminine (Lotz et al., 1997) De plus il y a accumulation cytoplasmique de chaînes $\gamma 2$ et $\alpha 3$ dans les cellules invasives localisées au front de migration des tumeurs coliques (Pyke et al., 1995).

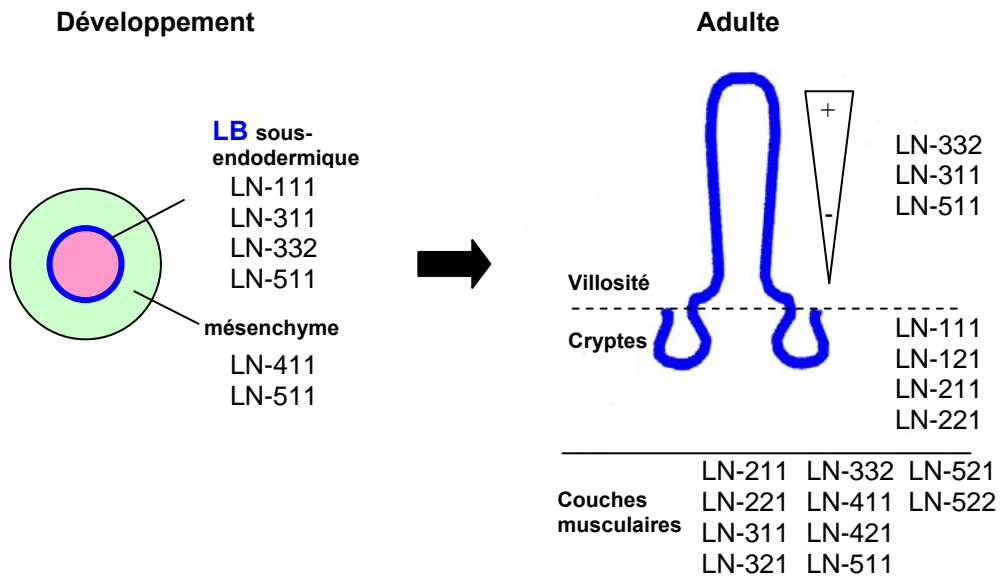


Figure 13 : Distribution des isoformes de laminine dans l'intestin embryonnaire et adulte

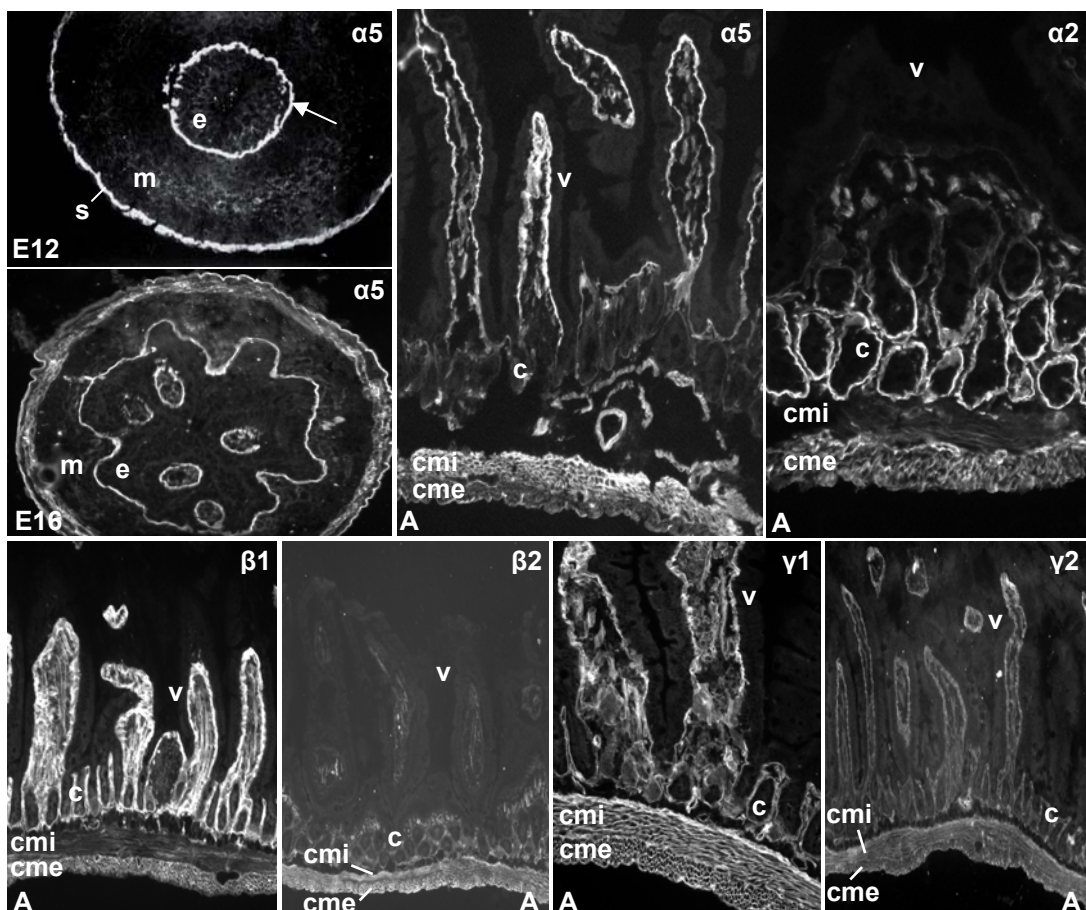


Figure 14 : Immunolocalisation de certaines chaînes de laminine dans l'intestin
e : endoderme, m : mésenchyme, s : séreuse, v : villosité, c : crypte, cmi : couche musculaire interne, cme : couche musculaire externe, E : stade embryonnaire, A : adulte.

d) Laminine-411 et -421 :

Au cours du **développement**, la chaîne $\alpha 4$ est exclusivement présente dans le compartiment **mésenchymateux**. Son expression augmente progressivement et se maintient dans l'intestin mature au niveau de la **lamina propria** et dans les lames basales qui entourent les **cellules musculaires lisses** (Lefebvre et al., 1999)

e) Laminine-511, -521 et -522 :

La chaîne $\alpha 5$ présente le profil d'expression le plus large dans l'intestin. Une forte expression de cette chaîne est retrouvée à un stade indifférencié de 11 jours de vie fœtale à l'interface entre l'endoderme et le mésenchyme ainsi que dans la séreuse (Lefebvre et al., 1999). Son expression suit ensuite l'émergence villositaire et apparaît dans la zone de différenciation du muscle lisse intestinal. Dans l'intestin adulte, la chaîne $\alpha 5$ reste très exprimée, au niveau **sous-épithélial** tout le long des villosités avec un gradient d'intensité croissant vers le sommet des villosités, et également dans les **couches musculaires**, de façon prépondérante dans la couche circulaire interne. La chaîne $\beta 2$ étant exclusivement présente dans la région des cryptes, nous pouvons en déduire que la laminine-511 est la seule présente dans la lame basale sous-épithéliale. Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée à l'étude du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine qui sera donc abordé ultérieurement.

Pour résumer, dans la **lame basale sous-épithéliale**, on retrouve tout d'abord dans l'**intestin fœtal**, une expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$. Puis dans l'**intestin mature**, sont présentes, au niveau **villositaire**, les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, et au niveau des **cryptes** les chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$.

Dans le compartiment **mésenchymateux**, l'expression des chaînes $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ apparaît lors de la différenciation du muscle. A la naissance, l'expression des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$ augmente dans cette région musculaire (figure 13).

Les profils d'expression de certaines de ces chaînes de laminines, révélés par immunofluorescence, sont illustrés sur la figure 14.

III. La chaîne $\alpha 5$ de laminine

Au cours de mon doctorat, je me suis principalement intéressée à la chaîne $\alpha 5$ de laminine qui représente la chaîne α de laminine **la plus ubiquitaire**. Elle est présente lors du **développement embryonnaire** et dans les tissus **adultes**. C'est la chaîne α de laminine majeure des lames basales sous-épithéliales. Elle peut former **4 isoformes** de laminine : la laminine-511, -521, -522 et -523 (figure 12B).

A. Le gène Lama5

Le gène Lama5 codant pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine se situe, chez la souris, sur le chromosome 2 et, chez l'homme, sur le chromosome 20 au locus 20q13.2-q13.3. Chez la souris, le gène mesure 49,36 kb et comprend 80 exons. La longueur du transcrit est de 11,259 kb codant pour une protéine de 3718 acides aminés et d'environ 400kD. Aucune étude de promoteur n'a été réalisée, à ma connaissance, pour le gène Lama5.

B. Profil d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

Le gène Lama5 est exprimé dès 4,5 jours de vie embryonnaire au stade blastocyste, dans la lame basale du trophoblaste polaire et autour des cellules de la masse cellulaire interne. Après l'implantation de l'embryon, son expression est localisée dans le stroma environnant et dans la lame basale embryonnaire entre l'ectoderme et l'endoderme viscéral et très peu dans la membrane de Reichert (Miner et al., 2004; Klaffky et al., 2001). A E 8,7, la chaîne $\alpha 5$ de laminine

est localisée au niveau des lames basales neurectodermique, ectodermique et endodermique. Après la fermeture du tube neural, son expression se restreint à la lame basalesous l'ectoderme de surface et à la lame basale sous-endodermique (Miner et al., 1998). Nous avons vu précédemment que cette chaîne est également fortement exprimée chez l'adulte dans de nombreux tissus incluant le rein, les poumons, le muscle squelettique, la peau et l'intestin (Tableau I, § IIC3d, figure 14).

C. Modèles murins d'étude *in vivo*

1. Invalidation génique de la chaîne $\alpha 5$

Une invalidation du gène *Lama5*, codant pour la chaîne $\alpha 5$, a été réalisée par recombinaison homologue chez la souris (Miner et al., 1998). 113 acides aminés des domaines VI, V et IVb ont été remplacés par une cassette *LacZ*/néomycine. Cette invalidation génique engendre une **léthalité foetale** des souris homozygotes mutantes entre 13,5 et 16,5 jours de développement embryonnaire. **La chaîne $\alpha 5$ est donc essentielle au développement foetal.** Les embryons mutants présentent de nombreuses anomalies : absence de fermeture du tube neural (exencéphalie), absence de séparation digitale (syndactylie), défauts sévères de placentation très certainement responsables de la léthalité, yeux absents ou atrophiés, problèmes de morphogenèse au niveau des poumons, des reins et du cœur qui comporte un ventricule gauche de taille réduite. Ces anomalies au niveau des organes ne causent pas la mort des embryons mais leur addition aux défauts de placentation contribue certainement à une mort plus précoce des embryons sévèrement atteints (Miner et al., 1998) (figure 15).

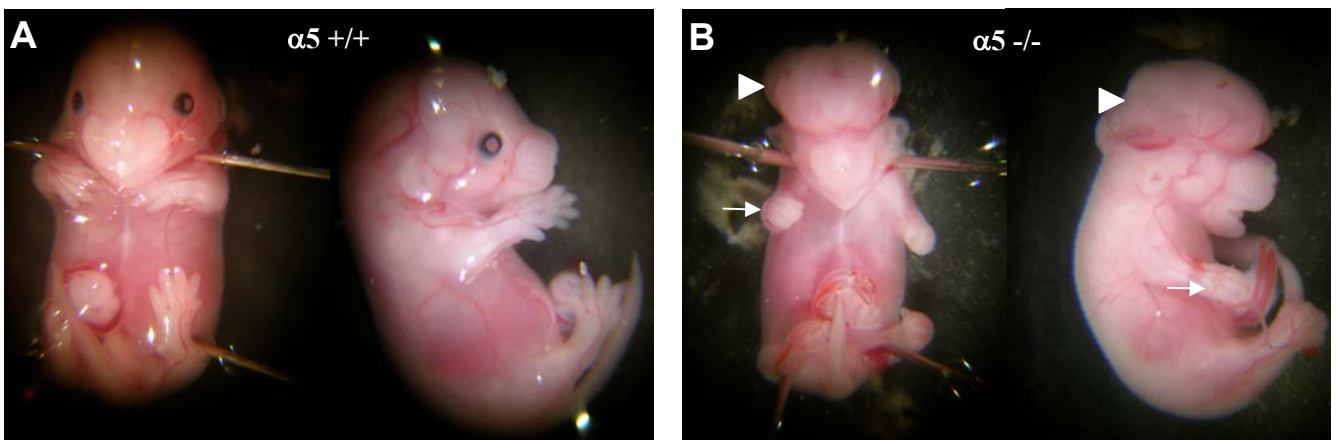


Figure 15 : Phénotype des embryons mutants *Lama5* $-/-$

(A) : Embryons sauvages à E15,5

(B) : Embryons mutants à E15,5: notez l'absence de séparation digitale (flèches) et l'exencéphalie (pointes de flèche)

2. *Lama5* « trap »

Dans le but de localiser l'expression de la chaîne $\alpha 5$ et d'identifier les compartiments tissulaires qui la sécrètent, une protéine rapporteuse a été placée après l'acide aminé 1763 de la chaîne $\alpha 5$ (figure 15). Le gène rapporteur correspondant consiste en fait en une fusion de la β -galactosidase avec la néomycine phosphotransférase (β geo). La protéine de fusion *Lama5* Trap contient ainsi la séquence signal d'exportation, les domaines VI, V, IVb, IIIb et la moitié du domaine IVa. Les

laminines étant des protéines sécrétées et l'activité de la β geo requérant une localisation cytoplasmique, un domaine transmembranaire de la protéine CD4 de rat a été ajouté en amont du rapporteur. Ainsi la partie de la protéine de fusion correspondant à la chaîne $\alpha 5$ sera bien extracellulaire mais β geo sera retenu dans le cytoplasme où il pourra donc remplir sa fonction de rapporteur (Yin et al., 2003). Les souris Lama5 « Trap » homozygotes meurent durant l'embryogenèse et présentent le même phénotype que les souris Lama5 $^{-/-}$. Ce sont donc les souris hétérozygotes Lama5 Trap/+ viables, normales et fertiles qui peuvent être utilisées pour l'analyse de l'expression du gène lama5

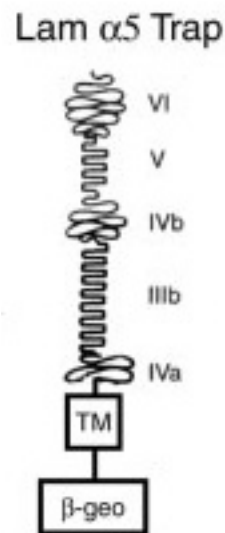


Figure 16 : Représentation de la protéine de fusion Lama5 Trap (Yin et al., 2003)
Un domaine transmembranaire TM a été placé entre la partie NH₂-terminale du gène Lama5 et le rapporteur β geo.

3. Souris transgéniques exprimant une chaîne α chimérique

Afin de déterminer la spécificité fonctionnelle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine par rapport aux autres chaînes α , des souris transgéniques exprimant une protéine chimère entre les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ ont été créées (Kikkawa et al., 2003). Les principaux sites d'interaction des chaînes α avec les récepteurs membranaires se situant au niveau des domaines globulaires (LG) de la région COOH-terminale, deux chaînes α chimériques ont été réalisées en remplaçant totalement ou partiellement des domaines LG de la chaîne $\alpha 5$ par ceux de la chaîne $\alpha 1$ (figure 17). Les souris transgéniques exprimant l'une ou l'autre de ces protéines chimères ont été croisées avec les souris Lama5 $^{-/-}$. Les souris ($\alpha 5^{-/-}$; N $\alpha 5+\alpha 1$ (LG1-5)) en résultant, où tout le domaine G a été interchangé, ne sont pas viables et présentent les mêmes défauts phénotypiques que les souris lama5 $^{-/-}$ mais avec une incidence moindre. En effet, alors que les embryons lama5 $^{-/-}$ sont de taille réduite, les embryons ($\alpha 5^{-/-}$; N $\alpha 5+\alpha 1$ (LG1-5)) ont une taille normale. Les souris ($\alpha 5^{-/-}$; N $\alpha 5+\alpha 1$ (LG3-5)), qui conservent donc les domaines LG1 et LG2 de la chaîne $\alpha 5$, naissent sans phénotype visible mais meurent au bout de quelques mois d'une insuffisance rénale. Ainsi, **les domaines LG1 et LG2 de la chaîne $\alpha 5$ sont indispensables au développement** et ceux de la chaîne $\alpha 1$ ne peuvent pas les compenser, ce qui indique une **grande spécificité fonctionnelle et signalitique propre à chaque chaîne α de laminine**.

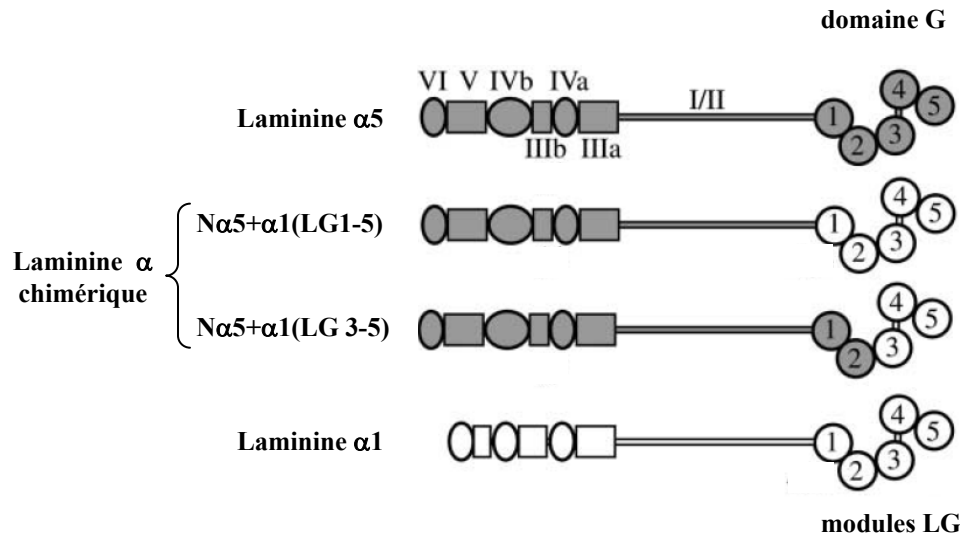


Figure 17 : Structure des chaînes α de laminine sauvages et chimériques
(Adapté de (Kikkawa et al., 2003))

4. Souris exprimant un allèle hypomorphe de la chaîne $\alpha 5$

Une souris exprimant un allèle hypomorphe de la chaîne $\alpha 5$ a été créée par insertion d'une cassette PGK*neo* dans l'intron 21 du gène Lama5 (Shannon et al., 2006). Le croisement de ces souris hétérozygotes Lama5^{+/*neo*} entre elles a permis de générer des souris homozygotes Lama5^{*neo/neo*} présentant donc une mutation au niveau des deux allèles Lama5. Ces souris expriment 2 à 8 fois moins d'ARN Lama5. De plus cet ARN est soumis à un épissage alternatif engendrant la traduction d'une protéine tronquée (perte de domaines LN et LEa) qui n'est vraisemblablement pas sécrétée. D'un point de vue phénotypique, les souris Lama5^{*neo/neo*} sont plus petites que les souris sauvages et meurent, vers le 28^{ème} jour post-natal, d'une **insuffisance rénale**. Ces souris constituent en fait un **modèle murin pour la polykystose rénale** chez l'homme.

5. Invalidation conditionnelle de la chaîne $\alpha 5$ dans le poumon

Un allèle Lama5 floxé a été généré par l'insertion d'un site LoxP dans l'intron 14 du gène Lama5 et d'un autre site LoxP dans l'intron 21. Les exons 15 à 21 encadrés par ces séquences LoxP codent pour 40% du domaine V. L'excision de ces exons par la recombinase Cre résulte en un ARNm avec décalage du cadre de lecture. Les souris Lama5^{fl/-} ont été croisées avec des souris SP-C-rtTA/tetO-cre exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de la protéine C du surfactant humain modifié pour être inducible par la doxycycline. Les souris SP-C-rtTA/tetO-cre /Lama5^{fl/-} (SP-CLama5^{fl/-}) ont reçu de la doxycycline dans l'eau de boisson en pré et post-partum à partir de E6,5 afin d'induire une invalidation de la chaîne $\alpha 5$ spécifiquement dans l'**épithélium pulmonaire** (Nguyen et al., 2005). Cette invalidation entraîne une **insuffisance respiratoire** et le décès des souris quelques heures après leur naissance.

6. Souris transgéniques sur-exprimant la chaîne $\alpha 5$

Des souris sur-exprimant la chaîne $\alpha 5$ ont été produites en plaçant l'ADNc complet de la chaîne $\alpha 5$ de laminine murine sous le contrôle du promoteur ubiquitaire miw (« widely active regulatory element »). L'analyse phénotypique de ces souris et les conséquences de la sur-expression au niveau des différents organes n'ont pas été publiées. A ce jour, une seule étude a utilisé ce

modèle pour montrer que la sur-expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine engendre une sur-expression d'un de ses récepteurs, le Luthéran dans le cœur embryonnaire où la chaîne $\alpha 5$ est normalement peu exprimée (Moulson et al., 2001).

D. Etudes *in vivo* des fonctions biologiques de la chaîne $\alpha 5$

Le rôle de la chaîne $\alpha 5$ a été appréhendé dans plusieurs organes par différentes équipes de recherche. L'analyse de ces études nous permettra de faire un état des lieux de ce qui est déjà connu sur le rôle de la chaîne $\alpha 5$, notamment dans des tissus autres que le tissu intestinal. Voici les principaux résultats obtenus et anomalies observées dans les modèles murins:

1. Syndactylie (figure 18)

Les extrémités des membres des embryons *Lama5* $-/-$, normalement palmées au départ, ne présentent **pas de séparation digitale** qui doit normalement avoir lieu vers E12,5. Elles prennent alors une forme de massue. Les membres antérieurs sont plus sévèrement atteints que les postérieurs, avec une soudure du cartilage des doigts 2 et 3 et une absence de phalanges distales au niveau des doigts 2, 3 et 4. L'analyse histologique a révélé au niveau des extrémités des pattes, la présence d'un trou dans l'épiderme à travers lequel migrent les cellules mésenchymateuses du derme. Il en résulte un épaissement de l'ectoderme de surface qui est recouvert de derme de part et d'autre avec la **formation ectopique d'une seconde lame basale** à l'interface ectopique ectoderme/derme. Ces lames basales présentent des défauts, notamment des **discontinuités**. Le mésenchyme interdigital est connu pour être impliqué dans la séparation digitale. Sa délocalisation chez les mutants pourrait expliquer l'absence de séparation des doigts (Miner et al., 1998).

L'expression de la protéine chimérique $N\alpha 5+\alpha 1(LG3-5)$ par les souris transgéniques $\alpha 5$ $-/-$ restaure complètement la syndactylie, contrairement à l'expression de $N\alpha 5+\alpha 1(LG1-5)$, ce qui permet de conclure à la **nécessité des domaines LG1-2 de la chaîne $\alpha 5$ pour la séparation digitale** (Kikkawa et al., 2006).

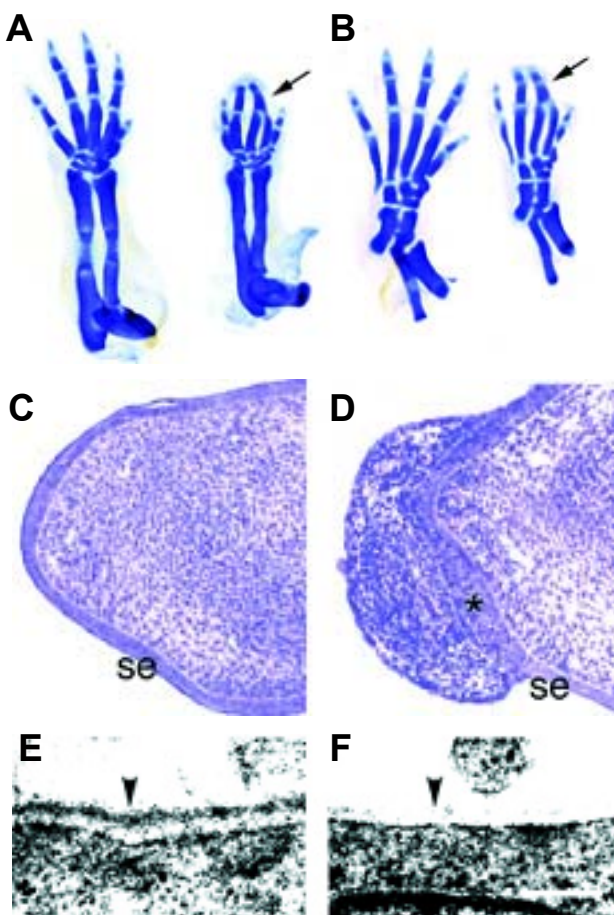


Figure 18 : Anomalies des membres des embryons *Lama5* $-/-$ (Miner et al., 1998)

(A-B): Les membres antérieurs (A) et postérieurs (B) des mutants (flèches à droite) présentent une fusion des doigts 2 et 3 et une absence de phalanges distales.

(C-D): Le marquage au bleu de toluidine de sections du segment distal des membres d'embryons E14,5 sauvage (C) et mutant (D) a révélé que l'ectoderme de surface (se), normalement continu, présente une brèche chez le mutant par laquelle se sont infiltrées des cellules mésenchymateuses. L'ectoderme est épaissi (*) et se retrouve pris entre deux couches de mésenchyme.

(E-F): L'analyse ultrastructurale du segment distal des membres a révélé une lame basale (pointe de flèche) dense et continue chez les embryons E14,5 sauvages (E) alors que la lame basale des mutants (F) est discontinue.

2. Exencéphalie

60% des embryons *Lama5* ^{-/-} présentent une **absence de voûte crânienne** consécutive à un **échec de fermeture du tube neural**. La lame basale ectodermique bordant le repli neural est **discontinue** et manque d'épaisseur chez les mutants (Miner et al., 1998). Or cette région de l'ectoderme semble impliquée dans la génération des forces permettant la fermeture du tube neural.

3. Dymorphogénèse placentaire (figure 19)

Les embryons *Lama5* ^{-/-} présentent des malformations du labyrinthe placentaire. Sa complexité diminuée et la dilatation des vaisseaux sanguins conduisent à une **insuffisance placentaire** très probablement responsable de la létalité embryonnaire. L'analyse ultrastructurale a montré que les cellules endothéliales et trophoblastiques normalement connectées par une lame basale sont, chez les mutants, séparées par un espace vide. Seules les cellules endothéliales adhèrent à une lame basale discontinue et d'épaisseur hétérogène. Au vu de ces données, la chaîne $\alpha 5$ de laminine semble nécessaire à l'élaboration de l'**arborescence sanguine** et de la **lame basale placentaire** et est essentielle à l'**adhésion du trophoblaste** à cette lame basale (Miner et al., 1998).

L'expression de la protéine chimérique $N\alpha 5 + \alpha 1$ (LG1-5) par les souris transgéniques *Lama5* ^{-/-} n'améliore ni la complexité du réseau vasculaire ni l'adhésion du trophoblaste à la lame basale placentaire qui n'est pas restaurée. Par contre, l'expression de la protéine chimérique ($\alpha 5$ ^{-/-} ; $N\alpha 5 + \alpha 1$ (LG3-5)) augmente la vascularisation placentaire et permet une structuration normale de la lame basale propice à l'adhésion du trophoblaste (Kikkawa et al., 2006). Nous pouvons en déduire que, de façon exclusive, les **domaines LG1 et LG2 de la chaîne $\alpha 5$ contiennent des sites de liaison au récepteur de surface des cellules trophoblastiques**.

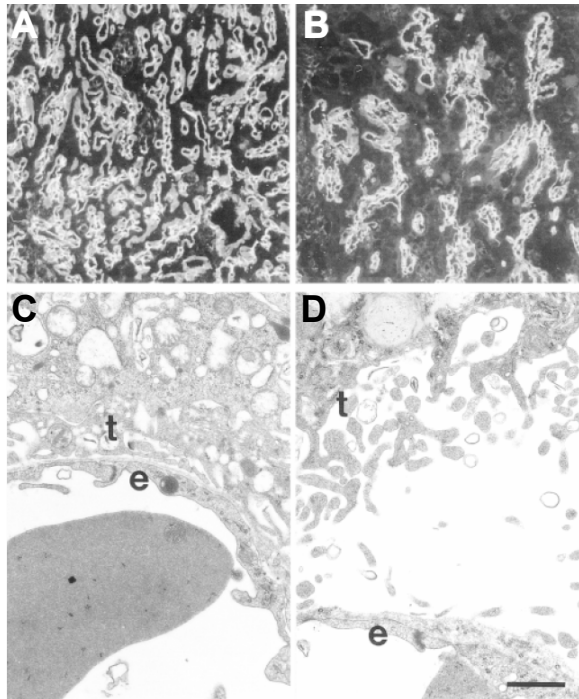


Figure 19 : Anomalies placentaires des embryons *Lama 5* ^{-/-} (Miner et al., 1998)

(A, B): Un immunomarquage de la chaîne $\gamma 1$ de laminine (révélation des lames basales sous-endothéliales) au stade E13,5 montre une diminution du nombre de vaisseaux sanguins et de la complexité des ramifications dans le placenta des embryons mutants (B) comparé au placenta des embryons contrôles (A).

(C, D): L'observation au microscope électronique à transmission du placenta d'embryon mutant (D), par rapport au placenta d'embryon sauvage (C), a révélé que l'endothélium (e) se trouve détaché du trophoblaste (t).

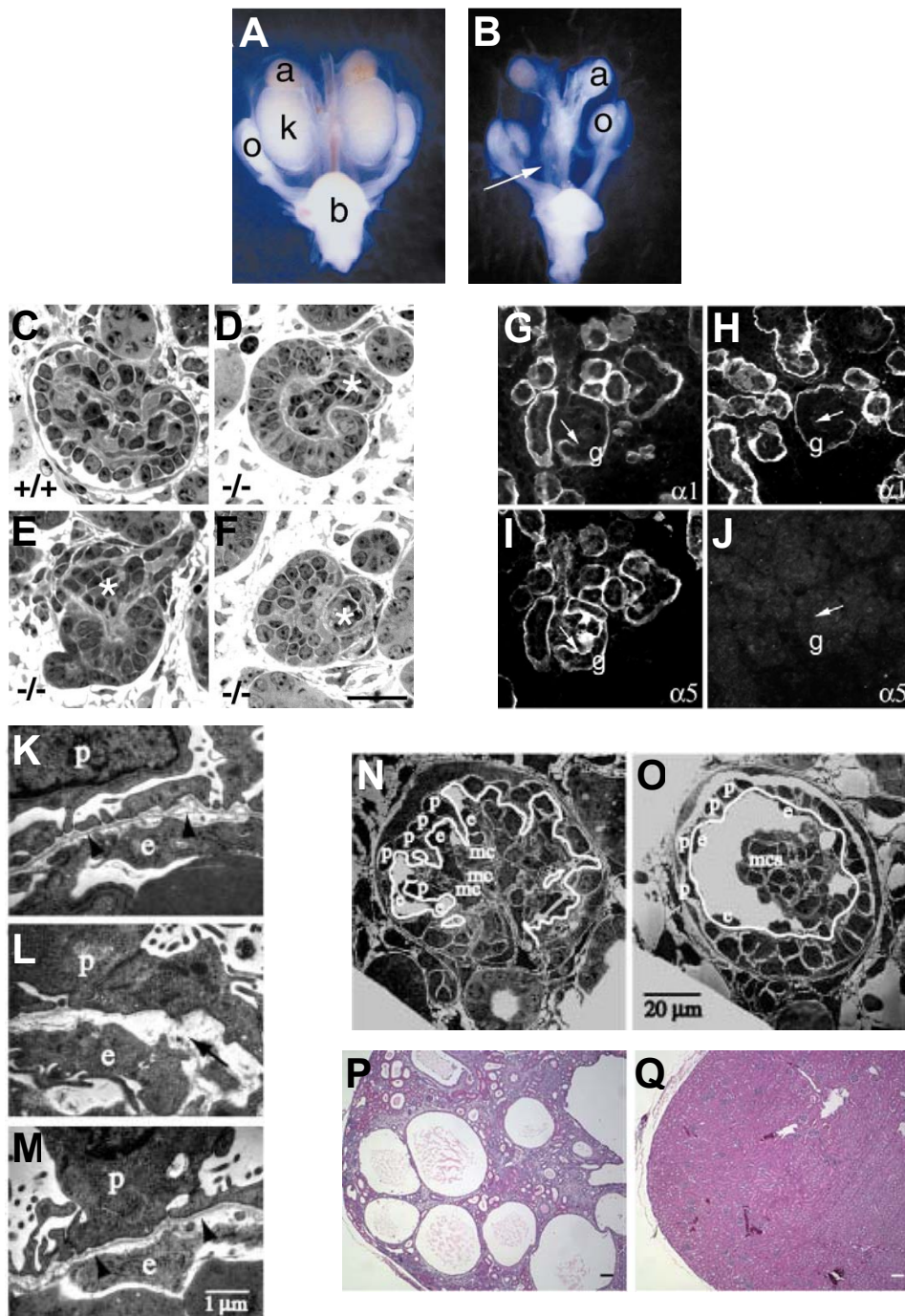


Figure 20 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le rein (Miner et al., 2000;Kikkawa et al., 2003;Shannon et al., 2006)

(A-B): Agénésie rénale chez les embryons E 14,5 *Lama5* $-/-$ (B) par rapport au sauvage (A)

a : glande surrénale, b : vessie, k : rein, o : ovaire

(C-F): Défaut de glomérulogénèse chez les embryons E16,5 *Lama5* $-/-$ (D, E, F : étapes consécutives) par rapport au sauvage (C). * montre l'exclusion cellulaire de l'intérieur du glomérule.

(G-J): Co-marquage des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ dans le rein embryonnaire E16,5 sauvage (G et I) et *Lama5* $-/-$ (H et J). g :glomérule

(K-M): La lame basale glomérulaire continue chez la souris sauvage (pointes de flèche en K) est désagrégée chez le mutant *Lama5* $-/-$ (flèche en L). L'expression de la protéine chimérique $N\alpha 5+\alpha 1$ (LG1-5) sauve l'assemblage de cette lame basale (pointes de flèche en M). e : cellule endothéliale p : podocyte,

(N-O): Dans les glomérules sauvages (N) les cellules mésangiales lient la lame basale glomérulaire et permettent ainsi le maintien d'une structure en anses. Dans le glomérule *Lama5* $-/-$ exprimant la protéine chimérique $N\alpha 5+\alpha 1$ (LG1-5), les capillaires sont distendus du fait du détachement des cellules mésangiales (mc) de la lame basale.

(P-Q) : Les souris *Lama5*^{neo/neo} présentent de nombreux kystes rénaux (P) par rapport à l'architecture du rein normal (Q)

4. Défauts de la morphogenèse rénale

Le rein est composé d'une multitude d'unités fonctionnelles nommées néphrons. Chaque néphron est un tubule mince constitué en un amas de capillaires appelés glomérules qui filtrent le plasma. La barrière de filtration est composée par trois couches: (i) l'endothélium fenestré (présence de petits pores) des capillaires qui constitue une barrière pour les éléments cellulaires du sang, (ii) la lame basale glomérulaire, (iii) les fentes de filtration formées par les podocytes (les podocytes présentent des prolongements appelés pédicelles qui constituent un réseau complexe de petites fentes). La lame basale glomérulaire, laissant passer uniquement les molécules de taille inférieure à 68kD, est ainsi essentielle à la filtration rénale. Les cellules endothéliales bordant les capillaires adhèrent à une des faces de la lame basale glomérulaire tandis que les podocytes adhèrent à l'autre face dans la chambre de filtration. De par leurs propriétés contractiles, les cellules mésangiales influencent la filtration glomérulaire en contrôlant le flux sanguin dans les capillaires.

Dans 20% des cas, les embryons mutants pour la chaîne $\alpha 5$ présentent une **absence d'un ou des deux reins**, parfois associée à une absence des uretères (figure 20 A, B). Les autres mutants ont des reins de taille réduite qui présentent des **défauts de glomérulogenèse**. En effet, les glomérules commencent par se développer normalement, puis, à un stade où l'on devrait normalement assister à un remodelage de la composition de la lame basale glomérulaire avec une perte d'expression de la chaîne $\alpha 1$ et remplacement par la chaîne $\alpha 5$ de laminine, la lame basale glomérulaire se désagrège induisant une exclusion des cellules endothéliales et mésangiales vers l'extérieur du glomérule et une désorganisation des podocytes (figure 20 C-L) (Miner et al., 2000). Outre son rôle de filtre, **la lame basale glomérulaire, de part la présence de la chaîne $\alpha 5$, est donc nécessaire à la glomérulogenèse et notamment à l'arrangement et à la différenciation des podocytes.**

L'expression de la laminine chimérique $N\alpha 5 + \alpha 1$ (LG1-5) par les souris $\alpha 5^{-/-}$ permet de sauver l'assemblage de la lame basale glomérulaire permettant ainsi un arrangement correct des podocytes en monocouche et une localisation normale des cellules endothéliales et mésangiales à l'intérieur du glomérule (figure 20 M) (Kikkawa et al., 2003; Kikkawa et al., 2006). Toutefois les podocytes présentent moins de pseudopodes, ce qui pourrait indiquer un rôle des domaines LG de la chaîne $\alpha 5$ dans les processus d'extension de la membrane plasmique. De plus, l'organisation en anses des capillaires glomérulaires est perturbée, indiquant un défaut au niveau des cellules mésangiales (figure 20 N, O). En effet, les cellules mésangiales sont détachées de la lame basale glomérulaire ce qui a permis de conclure à **l'adhésion spécifique des cellules mésangiales au domaine G de la chaîne $\alpha 5$** et que cette adhésion est essentielle à la structuration des capillaires glomérulaires. Des tests d'adhésion *in vitro* ont permis de montrer, par l'utilisation d'anticorps bloquants, que cette adhésion préférentielle des cellules mésangiales à la chaîne $\alpha 5$ de laminine par rapport à la chaîne $\alpha 1$ se fait *via* l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et secondairement par le récepteur Luthéran.

La culture d'explants rénaux sauvages ou issus de souris $Lama 5^{-/-}$ à E13,5, a révélé que l'absence de la chaîne $\alpha 5$ inhibe la **ramification du bourgeon de l'uretère**. Le développement de l'uretère semble être initié par des signaux émanant du mésenchyme métanéphrique. L'absence de chaîne $\alpha 5$ pourrait inhiber la transduction de ces signaux (Miner et al., 2000).

Nous avons vu précédemment que les souris $Lama^{neo/neo}$ exprimant des allèles $Lama 5$ hypomorphes présentent une **insuffisance rénale** associée à des polykystes (figure 20 P, Q) (Shannon et al., 2006). Ces kystes apparaissent vers P14 mais une dilatation des tubules rénaux est déjà visible à la naissance. Au sein de certains kystes, les cellules épithéliales perdent le contact avec la lame basale et leur polarité. Après 3 semaines de vie, une insuffisance rénale est présente et semble associée à un épaississement de la lame basale entourant les kystes, à une dédifférenciation et à une augmentation de la prolifération et de l'apoptose des cellules épithéliales présentes dans les kystes. Par ailleurs, la lame basale glomérulaire est présente, épaissie par endroits, mais présente certainement des brèches au vu de la protéinurie avérée chez

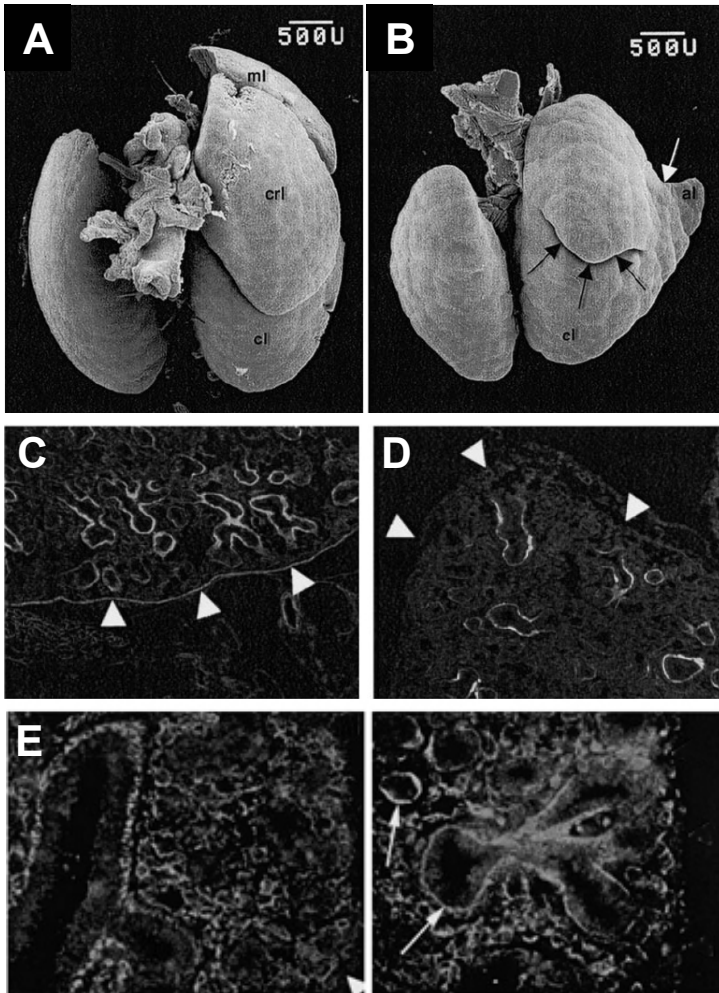


Figure 21 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement pulmonaire (Nguyen et al., 2002)
 (A-B): Poumon sauvage (A) et $Lama5^{-/-}$ (B) à E16,5. Les flèches noires montrent une séparation incomplète du lobe caudal du poumon droit chez le mutant. crl : lobe crânien, ml : lobe médian, cl : lobe caudal, al : lobe accessoire
 (C-D): La lame basale pleurale n'est pas formée dans les poumons $Lama5^{-/-}$ comme l'atteste cet immunomarquage de la chaîne $\gamma 1$ (D versus C).
 (E-F): Dans le poumon sauvage, la chaîne $\alpha 4$ de laminine n'est pas présente dans la lame basale des voies respiratoires. Elle est exprimée autour des cellules musculaires lisses (E). Dans le poumon $Lama5^{-/-}$, la chaîne $\alpha 4$ présente une expression ectopique au niveau des voies pulmonaires (flèches en F).

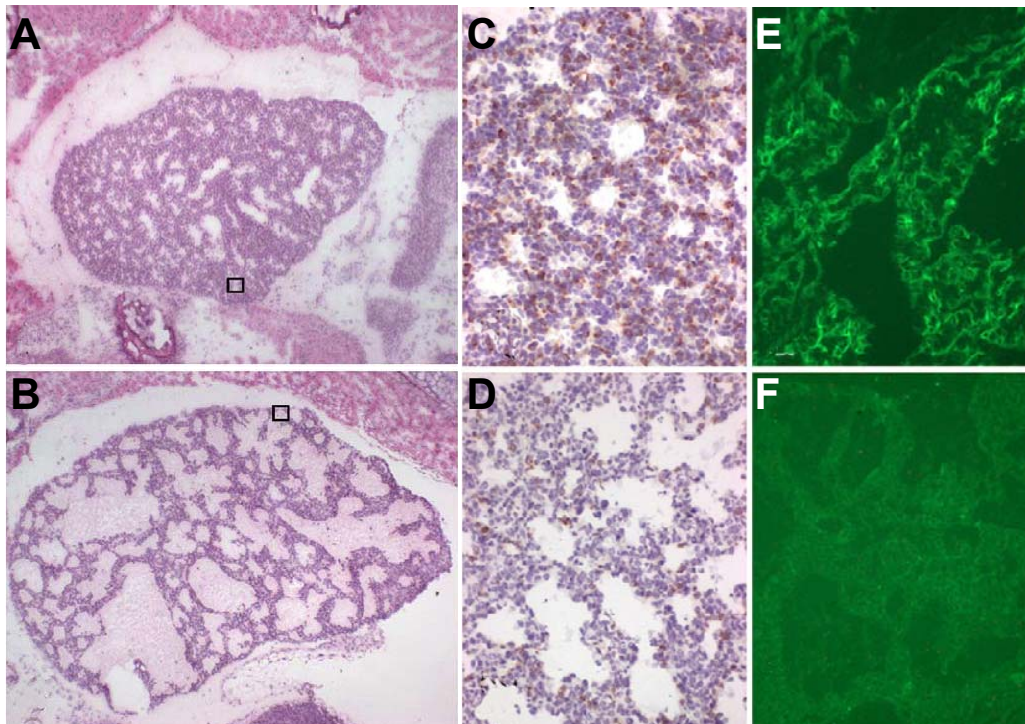


Figure 22 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement pulmonaire plus tardif (Nguyen et al., 2005)
 (A-B): Coupes histologiques de poumon sauvage (A) et $SP-CLama5^{fl/-}$ (B) à la naissance.
 (C-D): La chute d'expression du marqueur proSP-C dans le poumon $SP-CLama5^{fl/-}$ par rapport au poumon sauvage (D versus C) et de l'aquaporine-5 (F versus E) révèle un défaut de différenciation des cellules épithéliales alvéolaires de type II et I respectivement.

ces souris. Ces résultats suggèrent un **rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'homéostasie de l'épithélium rénal.**

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est donc indispensable au développement et à la fonction rénale.

5. Défauts du développement pulmonaire

Chez la souris, le développement des poumons débute vers E10 par l'évagination de l'épithélium de la trachée qui va progressivement former les bronches. Alors que le poumon gauche est composé d'un unique lobe, le poumon droit est lui divisé en 4 lobes distincts. Les voies aériennes se divisent en fait de façon dichotomique : chaque bronche mère donne 2 bronches filles. Il y a 23 générations de voies aériennes pour arriver aux bronchioles qui vont amener l'air dans les alvéoles pulmonaires. Une lame basale borde l'épithélium respiratoire qui tapisse la lumière bronchique. La plèvre limite le poumon en périphérie. Elle comprend un feuillet interne viscéral et un feuillet pariétal, chaque feuillet étant constitué d'un épithélium unistratifié fait de cellules mésothéliales qui reposent sur une lame basale pleurale.

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est exprimée dès E11,5 au niveau de la lame basale bordant l'épithélium pulmonaire et au niveau de la lame basale de la plèvre viscérale. Les souris Lama5^{-/-} présentent un **défaut architectural au niveau du poumon droit** (Nguyen et al., 2002). En effet la **séparation lobaire est très incomplète** (Figure 21 A, B). Cette anomalie pourrait être attribuée à l'absence de chaîne $\alpha 5$ au sein de la lame basale de la plèvre viscérale. En effet, la chaîne $\alpha 5$ y est normalement la seule chaîne α présente et son absence n'est pas compensée par l'expression d'autres chaînes α . Il en résulte une **absence de formation de lame basale pleurale viscérale** (Figure 21 C, D, F). En revanche, les souris Lama5^{-/-} présentent une morphogénèse tout à fait normale de l'arbre bronchique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont conjointement exprimées au niveau de la lame basale pulmonaire et que, en plus, l'absence de chaîne $\alpha 5$ y induit une expression ectopique de la chaîne $\alpha 4$ (Figure 21 E, F).

Afin de pouvoir étudier l'implication de la chaîne $\alpha 5$ de laminine à des stades plus tardifs du développement pulmonaire, une invalidation conditionnelle du gène Lama5 a été réalisée chez la souris (souris SP-CLama5^{fl/-}) par utilisation du système Cre/Lox et du système Tet-On (Nguyen et al., 2005) (voir § III.C.5). Les souris SP-CLama5^{fl/-} présentent une **insuffisance respiratoire** à la naissance et meurent en quelques heures. La séparation lobaire du poumon droit est normale. Mais par contre la **quantité de parenchyme des poumons est réduite** suite à une **baisse de la prolifération** et à une **augmentation de l'apoptose** des cellules. On retrouve également une dilatation des voies respiratoires associée à la présence intra-luminale de nombreux débris cellulaires et à un **défaut de différenciation des cellules épithéliales** (Figure 22 A, B). La lame basale pulmonaire est pourtant bien formée peut-être du fait de la compensation par l'expression ectopique de la chaîne $\alpha 4$. Cependant la **densité du réseau vasculaire est très réduite** avec une chute d'expression du VEGF. De plus l'absence de chaîne $\alpha 5$ au niveau des alvéoles compromet la différenciation des cellules alvéolaires de type I et II (Figure 22 C-F). **La chaîne $\alpha 5$ a donc une fonction importante dans la maturation alvéolaire et dans les stades tardifs de développement des poumons.**

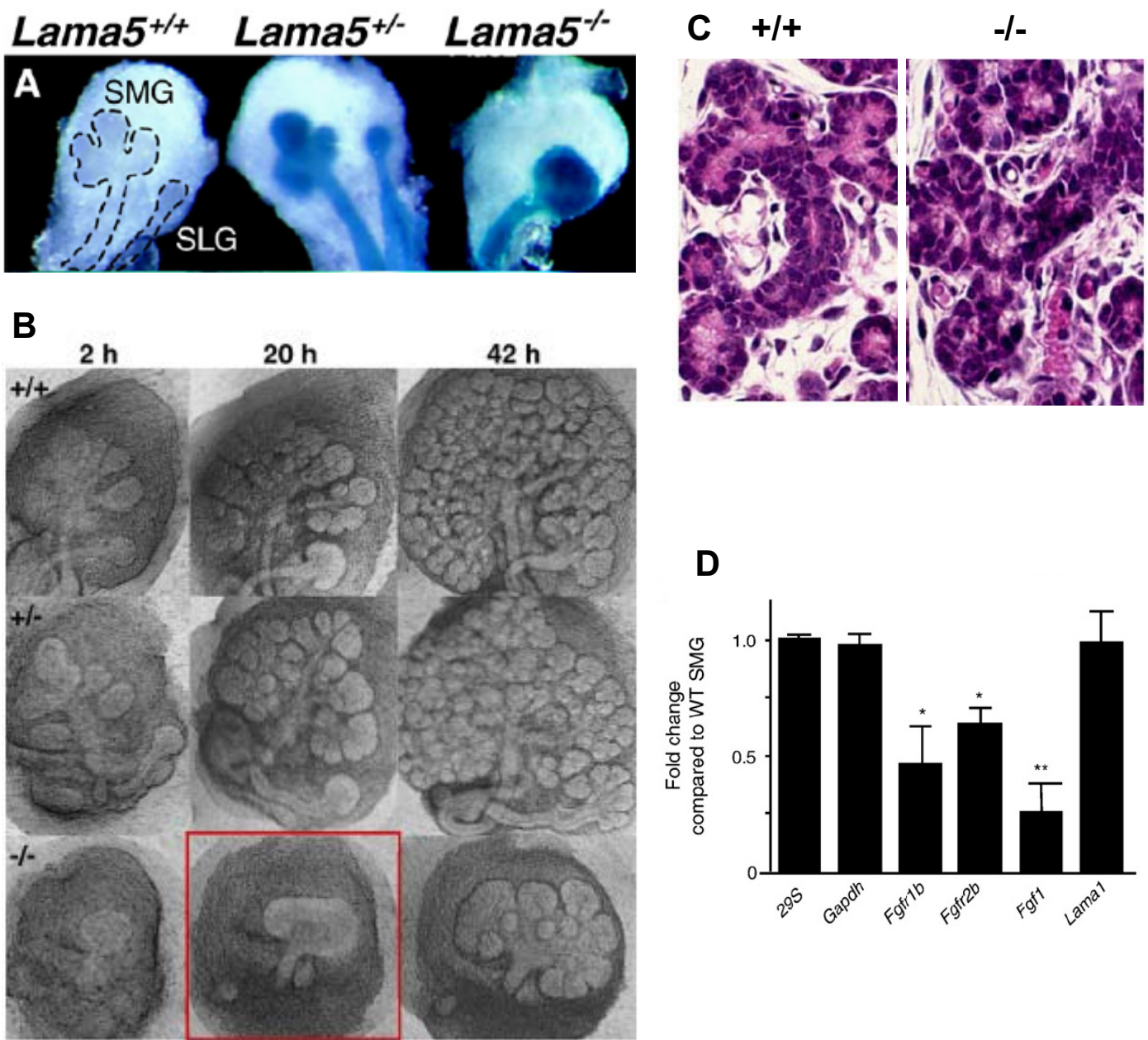


Figure 23 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement des glandes salivaires (Rebustini et al., 2007)

(A) : Localisation de l'expression de *Lama5* à E13 par marquage à la β -galactosidase utilisant l'insertion du gène *LacZ* au niveau du locus *Lama5*. SMG : glande sous-maxillaire ; SLG : glande sublinguale.

(B) : Culture d'explants de glandes sous-maxillaires : la ramification lobulaire est très ralentie dans les explants issus de souris *Lama5*^{-/-}.

(C) : L'analyse histologique à E17 a révélé une anomalie d'organisation des cellules épithéliales et une lumière réduite.

(D) : Comparaison d'expression des gènes *Fgfr1b*, *Fgfr2b*, *Fgf1* et *Lama1* entre les souris *Lama5*^{-/-} et les souris sauvages par RT-PCR quantitative en temps réel.

6. Défauts de morphogenèse des glandes salivaires

Les glandes sous-maxillaires constituent un excellent modèle d'étude du phénomène de ramification lors de la morphogenèse. Ce sont des glandes salivaires lobulées et leurs canaux excréteurs sont longs et très ramifiés : canaux intralobulaires, puis interlobulaires et enfin collecteurs. Leur portion sécrétrice est faite d'acini ou tubulo-acini où l'on trouve les cellules sécrétrices bien polarisées, entourées de cellules myoépithéliales. Une lame basale entoure les acini et les canaux excréteurs.

La chaîne $\alpha 5$ est exprimée dès le début du développement de la glande à E13, au niveau des lames basales des bourgeons et au niveau de celles des canaux. Les souris Lama5^{-/-} présentent un **retard de croissance de la glande sous-maxillaire** et une **absence de formation de la glande sublinguale**. (Rebustini et al., 2007) (Figure 23A). **Les ramifications lobulaires se forment difficilement** pour aboutir finalement à un nombre très réduit de bourgeons au sein desquels **les cellules épithéliales sont désorganisées** et la lumière très restreinte (Figure 23B, C). Il n'y a pas de compensation par surexpression d'autres chaînes α de laminine (illustré pour $\alpha 1$ par RT-QPCR : Figure 23D). En revanche, on assiste à l'accumulation cytoplasmique des chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$, conséquence de leur non-sécrétion du fait de l'impossibilité de s'associer en trimère avec la chaîne $\alpha 5$. La culture d'explants avec des siRNA anti-chaîne $\alpha 5$ ont permis de conclure que la chaîne $\alpha 5$ contrôle la ramification lobulaire de la glande sous-maxillaire via la régulation de l'expression des récepteurs au FGF (Figure 23D) et de la voie p42 MAPK. Des expériences *in vitro* utilisant des peptides bloquants correspondant à des séquences du domaine G de la chaîne $\alpha 5$ ont permis de montrer que c'est le domaine LG4 qui est déterminant pour la ramification lobulaire (Kadoya et al., 2003).

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est donc essentielle à l'initiation de la formation des glandes sublinguales et à la morphogenèse correcte des glandes sous-maxillaires.

7. Défauts du développement dentaire

Le développement des dents débute à E11,5 par la formation, à partir de la couche basale de l'épithélium de la cavité orale, d'une lame dentaire le long des mâchoires supérieure et inférieure. Cette lame dentaire donne naissance aux bourgeons dentaires qui sont la composante ectodermique des dents. Puis la partie profonde des bourgeons s'invagine, formant une structure en capuchon composée d'un épithélium dentaire externe et d'un épithélium dentaire interne. Le mésenchyme forme la papille dentaire. Une lame basale continue est interposée entre les deux tissus. Les cellules mésenchymateuses qui jouxtent l'épithélium dentaire interne se différencient en odontoblastes, responsables de la formation de la dentine. Le reste du mésenchyme forment la pulpe de la dent. En parallèle, les cellules de l'épithélium dentaire externe se différencient en améloblastes, responsables de la formation des prismes d'émail qui se déposent sur la dentine.

Les souris Lama5^{-/-} présentent une **anomalie d'organisation de l'épithélium à l'origine du bourgeon dentaire** et ce dès le stade d'initiation (Fukumoto et al., 2006). En effet, cet épithélium n'est pas organisé en monocouche comme il se devrait. Un bourgeon se forme tout de même mais il est de taille réduite et difforme (Figure 24A). Le nodule épithélial « enamel knot », centre signalitique pour le développement dentaire, est défectueux avec une chute **d'expression de Shh et Fgf4** et le maintien de la prolifération cellulaire alors que normalement les cellules devraient entrer en apoptose pour former une concavité (figure 24B, C). A E17,5, l'épithélium interne n'est pas polarisé et la lame basale qui le soutient est discontinue (figure 24D).

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est donc essentielle à la morphogenèse des dents.

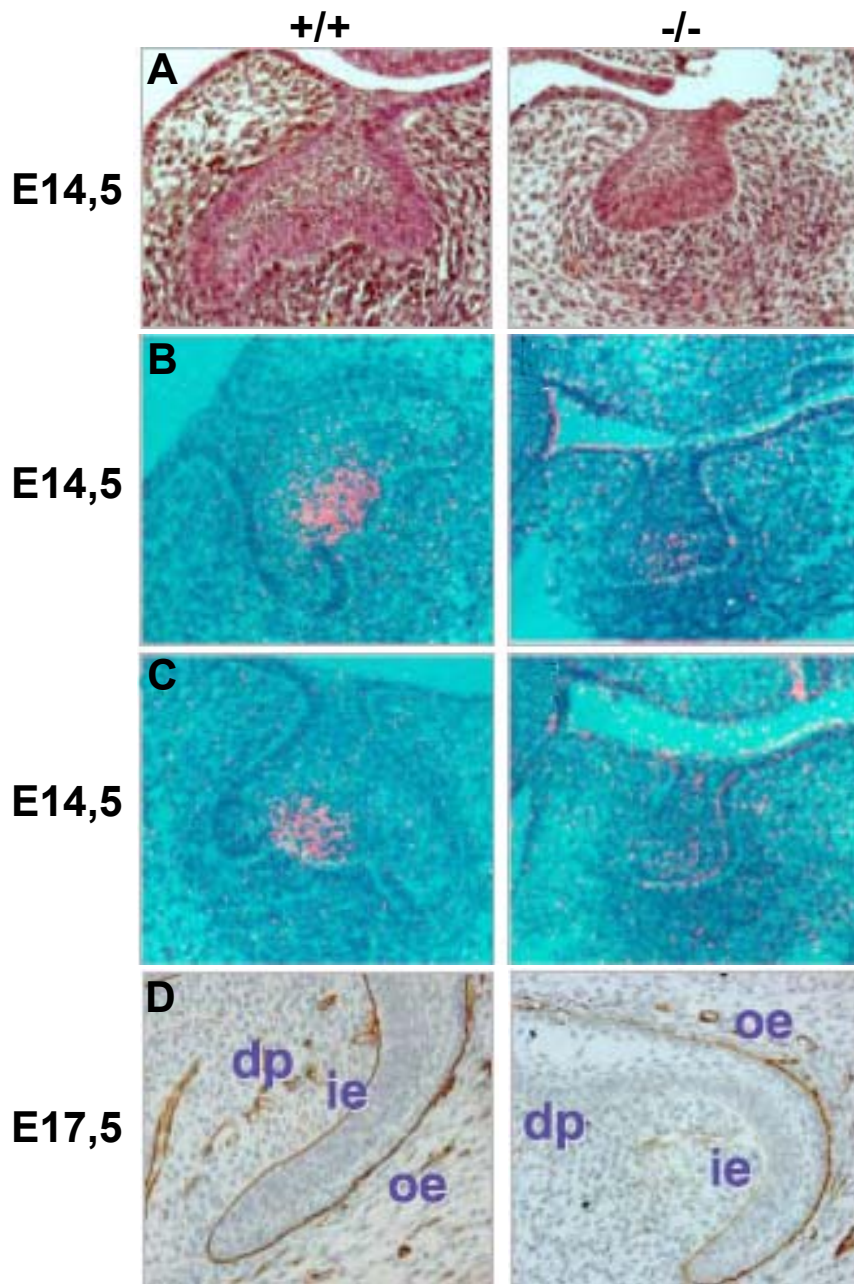


Figure 24 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement dentaire (Fukumoto et al., 2006)

(A) : Coupes histologiques révélant une dysmorphogénèse du bourgeon dentaire des souris Lama5^{-/-}.
 (B-C) : Hybridation *in situ* pour Fgf4 (B) et Shh (C) révélant une perte d'expression au niveau du nodule épithélial des bourgeons dentaires Lama5^{-/-}.

(D) : Immunomarquage du collagène IV montrant une discontinuité de la lame basale sous l'épithélium interne du bourgeon Lama5^{-/-}. dp : pulpe dentaire, ie : épithélium dentaire interne, oe : épithélium dentaire externe.

8. Défauts de morphogénèse des follicules pileux

Se développant dans le derme et le tissu conjonctif sous-cutané à partir d'invaginations épidermiques, les follicules pileux sont à l'origine des poils. La partie la plus profonde du follicule consiste en un amas cellulaire appelé matrice germinale ; elle recouvre une papille de tissu conjonctif qui renferme les vaisseaux sanguins irriguant le follicule. La matrice germinale est à l'origine même du poil : en proliférant, ses cellules repoussent les cellules superficielles vers l'extérieur. Ces cellules se kératinisent et forment le poil.

La chaîne $\alpha 5$ est très exprimée pendant l'élongation folliculaire contrairement aux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ dont l'expression chute. A E16,5, la peau des souris Lama5^{-/-} présente des follicules pileux mais 2 fois moins nombreux que chez les souris sauvages (figure 25A) (Li et al., 2003a). L'étude ultérieure n'étant pas possible du fait de la létalité embryonnaire, des greffes de peau ont été réalisées au niveau de la peau de souris nude afin de poursuivre le développement. 28 jours après la greffe, les greffons issus de peau de souris $\alpha 5$ ^{-/-} ne présentent aucun poil et aucun follicule pileux en comparaison des greffons sauvages (figure 25B, C). Les germes, pourtant encore présents 5 jours après la greffe, régressent du fait de l'absence de chaîne $\alpha 5$. La préincubation des greffons Lama5^{-/-} avec de la laminine-511 purifiée permet d'obtenir une belle expression et une localisation classique de la laminine-511 exogène qui engendre une reconstitution de la lame basale discontinue observée dans la peau des souris mutantes (figure 25D) et prévient la dégénérescence des follicules pileux. **La chaîne $\alpha 5$ semble donc nécessaire à l'assemblage correct de la lame basale à l'interface épiderme/derme et à la formation des follicules pileux.** Par ailleurs les souris Lama5^{-/-} ne présentent aucun problème de cohésion épidermale, contrairement aux souris invalidées pour la chaîne $\alpha 3$ de laminine qui présentent une épidermolyse bulleuse mais des follicules pileux bien formés. Cette observation démontre bien la spécificité fonctionnelle des isoformes de laminine au sein d'un même tissu.

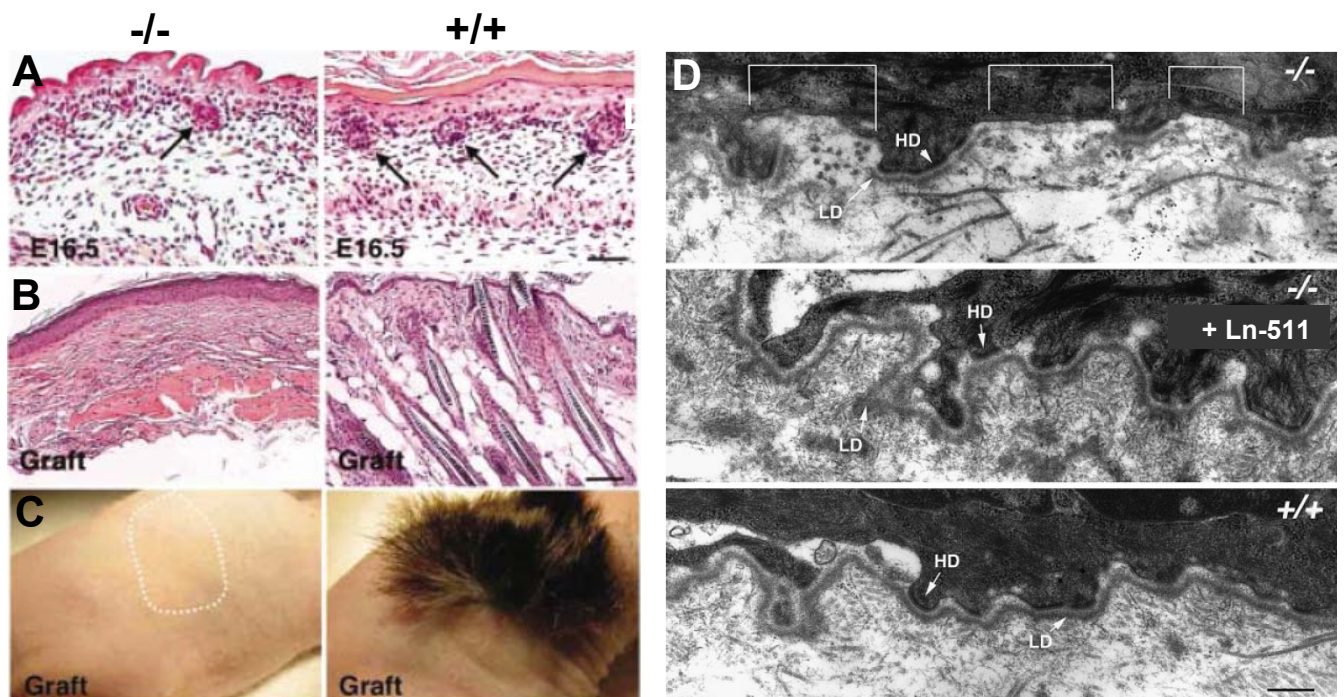


Figure 25 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement des follicules pileux (Li et al., 2003a)

(A-C) : Morphologie de la peau de souris Lama5^{-/-} à E16,5 avant (A) et après 28 jours de greffe sous la peau de la souris nude (B). Nous pouvons observer un nombre réduit de follicules pileux à E16,5 dans la peau des souris Lama5^{-/-} par rapport à celle de souris sauvage (A). Lorsque le développement de la peau est poussé dans le temps par greffe (B), les follicules finissent par totalement disparaître dans la peau des souris Lama5^{-/-} (B, C).

(D) : Le défaut d'assemblage de la lame basale (accolades) dans la peau des souris Lama5^{-/-} est corrigé par l'apport de laminine-511 exogène. LD : lamina densa, HD : hémidesmosomes.

9. Défaut de migration des cellules de la crête neurale

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est surexprimée durant l'induction de la crête neurale et son expression suit les trajets migratoires des cellules de la crête neurale mais de façon adjacente. Les souris Lama5^{-/-} présentent des voies migratoires plus étendues que les souris sauvages révélées par l'expression de Sox10 (figure 26). La chaîne $\alpha 5$ semble donc avoir un effet non permissif sur la migration des cellules de la crête neurale et permettrait ainsi la **délimitation de leurs voies de migration**. Par ailleurs, les souris Lama5^{-/-} montrent un **décalage de formation des neurones périphériques** associé à un retard d'expression de Sox10 et NeuroD à E10 (Coles et al., 2006). **La chaîne $\alpha 5$ de laminine semble donc être requise pour la migration des cellules de la crête neurale.**

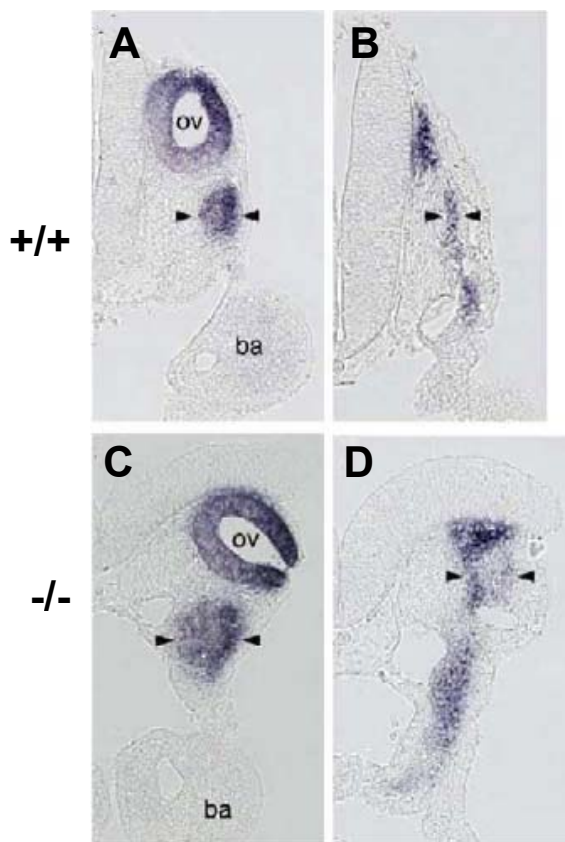


Figure 26 : Expansion des voies de migration des cellules de la crête neurale chez les souris Lama5^{-/-} (Coles et al., 2006)

Des hybridations *in situ* avec une sonde Sox10 (marqueur des cellules de la crête neurale en migration) au niveau des arcs branchiaux (A, C) et du segment vagal (B, D) montre un élargissement des voies migratoires des cellules de la crête neurale chez les embryons E9,5 Lama5^{-/-} par rapport aux souris sauvages..

10. Implication dans le système nerveux central

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est la chaîne α de laminine majoritairement exprimée dans l'hippocampe et plus précisément dans la couche de cellules neuronales. L'induction de la mort neuronale par injection de kainate, un analogue du glutamate, dans l'hippocampe de souris sauvage entraîne une chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$ (figure 27). Cette chute n'a pas lieu lorsque l'injection est réalisée dans des souris invalidées pour le gène PLAT (« Tissue plasminogen activator/plasmin ») indiquant que cette protéase extracellulaire est responsable de la dégradation de la chaîne $\alpha 5$ précédant la mort neuronale chimiquement induite (Indyk et al., 2003). **Cette étude suggère que la chaîne $\alpha 5$ de laminine est requise pour la survie des cellules neuronales.**

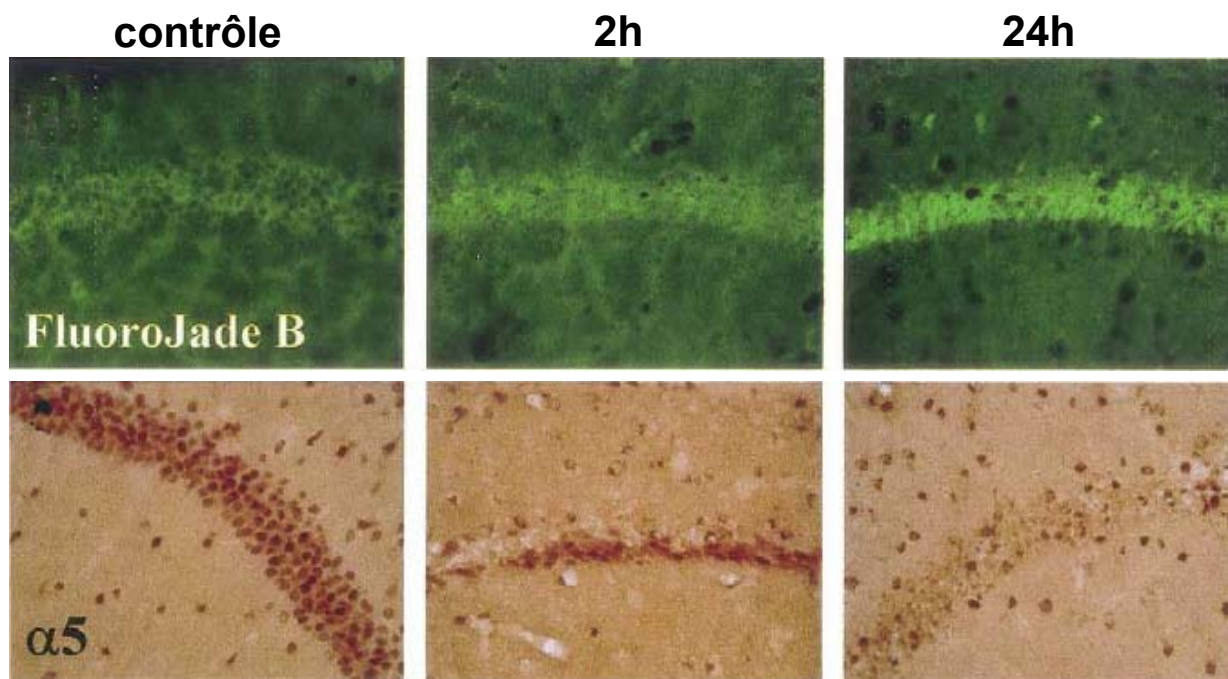
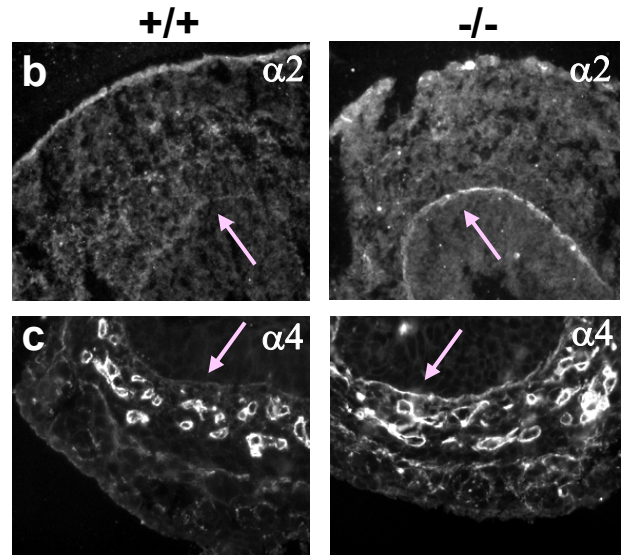
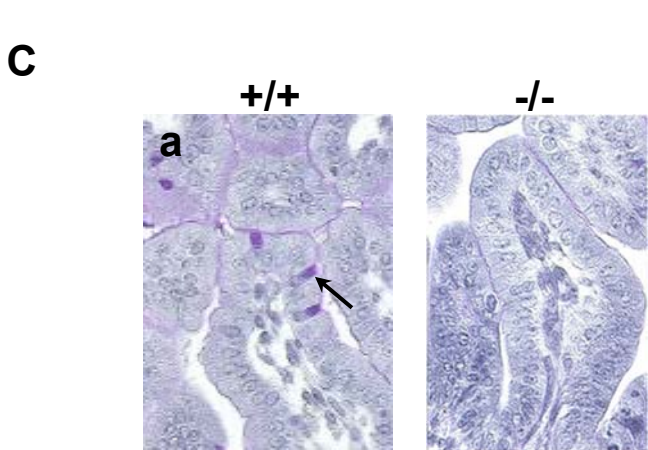
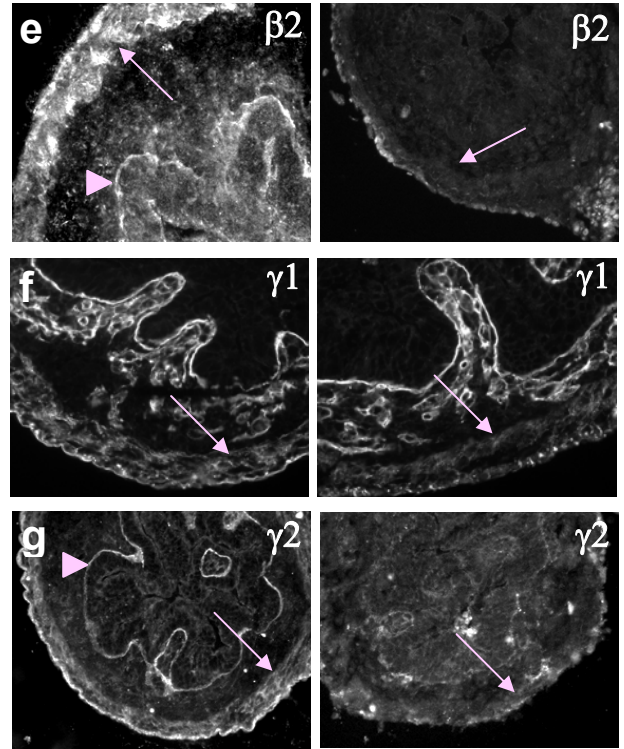
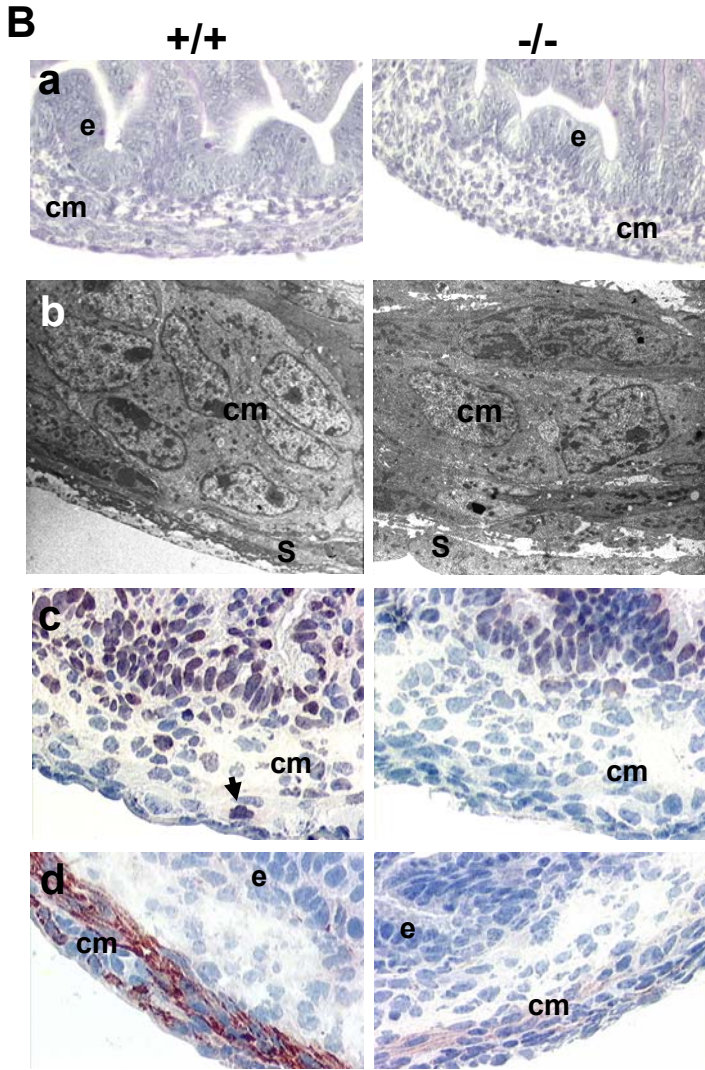
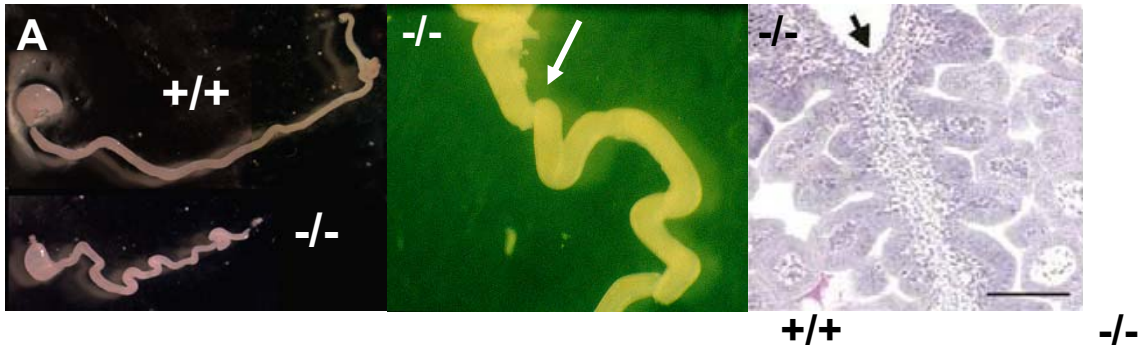


Figure 27 : Implication de la chaîne $\alpha 5$ dans le système nerveux central (Indyk et al., 2003)

Les coupes contrôles correspondent à des coupes d'hypothalamus de souris saine. Des coupes d'hypothalamus prélevés 2h et 24h après injection de kainate sont présentées à droite du contrôle. Le fluorochrome FluoroJade B marque spécifiquement les neurones en dégénérescence. Le marquage est d'autant plus intense que l'altération est importante. La chaîne $\alpha 5$, fortement exprimée dans les neurones, est dégradée parallèlement à la dégénérescence neuronale consécutive à l'injection de kainate.

11. Phénotype intestinal des souris Lama5^{-/-}

L'existence d'un phénotype intestinal a été démontrée au laboratoire (Bolcato-Bellemin et al., 2003). En effet, les intestins embryonnaires Lama5^{-/-} ont une **taille** réduite de 2 fois par rapport aux intestins sauvages. Le diamètre du tube digestif reste inchangé mais les intestins mutants présentent de **nombreuses circonvolutions** avec, dans environ 50% des cas, une soudure des anses intestinales correspondant à une **fusion des couches musculaires** associée à l'absence de séreuse et de mésentère (figure 28A). Les zones musculaires non fusionnées montrent tout de même des anomalies au niveau des cellules mésenchymateuses qui ne s'allongent pas, restent rondes et ne prolifèrent pas (figure 28Ba, c). Il y a également une perte de contact entre les cellules mésenchymateuses et la séreuse (figure 28Bb). De plus **la différenciation musculaire est perturbée** comme l'indique une très faible expression de la desmine (figure 28Bd) et de l' α -actine à E14 et E16 dans les intestins mutants par rapport aux intestins sauvages. Les plexus entériques semblent bien structurés. L'invalidation de la chaîne $\alpha 5$ s'accompagne, dans les lames basales du muscle lisse intestinal, d'une baisse d'expression d'autres chaînes de laminines : les chaînes $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$ (figure 28Be-g). Au niveau villositaire, aucun défaut de morphogenèse n'a été remarqué. Par contre, les intestins $\alpha 5$ ^{-/-} présentent une diminution du nombre de cellules à mucus (figure 28Ca). La différenciation entérocytaire semble normale avec une belle expression de la villine et la présence d'une bordure en brosse. La lame basale sous-épithéliale est présente



malgré l'absence de chaîne $\alpha 5$, comme le montre, par exemple, l'expression de la chaîne $\gamma 1$ (figure 28Bf), avec toutefois quelques irrégularités au niveau ultrastructural. L'expression des chaînes $\beta 2$ et $\gamma 2$ chute également au niveau de la lame basale sous-épithéliale (figure 28 Be, g). L'absence de défauts majeurs au niveau villositaire est probablement le fait d'une compensation moléculaire par l'expression ectopique, d'origine mésenchymateuse, des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ de laminine au niveau de cette lame basale (figure 28Cb, c). Par ailleurs, l'absence de chaîne $\alpha 5$ est accompagnée d'une baisse d'expression des sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 1$ d'intégrine à la base des cellules épithéliales et du récepteur Luthéran, principalement dans le muscle, tous deux connus pour être des récepteurs de la chaîne $\alpha 5$.

Afin de passer outre la létalité embryonnaire, des intestins Lama5^{+/+} et Lama5^{-/-} prélevés à E12 et E14 ont été greffés sous la peau de souris nude. Au bout d'un mois de développement, les greffons $\alpha 5$ ^{-/-} ont développé des villosités et ne présentent pas de différences morphologique et histologique par rapport aux greffons d'intestin sauvage. Le nombre de cellules à mucus est normal et les couches musculaires sont bien différenciées indiquant un « rattrapage » du phénotype. Ceci peut être attribué à une compensation moléculaire par une augmentation d'expression de la chaîne $\alpha 1$ au niveau villositaire, par une expression ectopique des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ le long des villosités et une sur-expression de la chaîne $\alpha 4$ au niveau musculaire non observée à des stades plus précoces de développement.

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est donc essentielle au développement du muscle lisse intestinal.

Figure 28: Phénotype des intestins de souris lama5^{-/-} (Bolcato-Bellemin et al., 2003)

(A) Les intestins mutants Lama5^{-/-} (E16) présentent des circonvolutions plus importantes que les intestins sauvages, avec soudure des anses intestinales due à une fusion des couches musculaires (indiquées par les flèches) dans les cas les plus sévères.

(B) Défauts du muscle lisse en développement. Désorganisation des cellules musculaires lisses en développement dans les intestins mutants (a), avec perte de contact avec les cellules séreuses sous-jacentes (b) et diminution de la prolifération cellulaire attestée par un marquage au KI67 (flèche en c). Immunomarquage de la desmine dans les intestins $\alpha 5$ ^{+/+} et $\alpha 5$ ^{-/-} à E16 (d). Analyse de la composition des lames basales musculaire (flèches) et sous-épithéliale (têtes de flèche) par immunodétection de chaînes de laminine (e-g). e : endoderme, cm : couches musculaires, s : séreuse.

(C) Anomalies villositaires. Marquage au PAS révélant une diminution du nombre de cellules à mucus dans les intestins $\alpha 5$ ^{-/-} à E16 (a). Expression ectopique des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ dans la lame basale sous-épithéliale des intestins $\alpha 5$ ^{-/-} à E14 (b, c).

E. Implications de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans des pathologies.

Peu d'études ont porté sur l'analyse de l'implication de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les pathologies humaines.

Une augmentation de son expression a été détectée chez les patients atteints de diverses dystrophies musculaires révélant un **rôle potentiel de la chaîne $\alpha 5$ dans la régénération musculaire**. Cette sur-expression, confirmée dans des modèles animaux, n'est pas corrélée avec la perte d'expression de la chaîne $\alpha 2$ de laminine responsable de certaines dystrophies congénitales (Patton et al., 1999). Une étude portant sur le diabète de type II a révélé que les souris diabétiques db/db présentent une accumulation de chaîne $\alpha 5$ dans le rein au niveau des lames basales glomérulaire et tubulaire et dans le mésangium (Ha et al., 1999). Les patients atteints de polyglobulie de Vaquez (Polycythemia Vera) due à une mutation du gène JAK2, codant pour une tyrosine kinase, présentent un risque accru de thrombose. Ce risque s'explique par le fait que les globules rouges de ces patients ont 3,7 fois plus d'affinité à se lier à la chaîne $\alpha 5$ de laminine de la lame basale endothéliale *via* leur récepteur Luthéran (Wautier et al., 2007). De façon intéressante, un peptide de la chaîne $\alpha 5$ est capable d'induire l'activation de macrophage murins en culture et l'expression des métalloprotéases MMP-9 et MMP-14, de TNF- α et de son récepteur p75TNFR. Ce peptide a également un effet chimioattracteur sur les neutrophiles et macrophages *in vitro* et *in vivo* mettant un évidence un **rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'inflammation** (Adair-Kirk et al., 2003; Adair-Kirk et al., 2005).

Enfin, quelques études ont porté sur **l'implication de la chaîne $\alpha 5$ dans les cancers**. Mais ces études ont été réalisées pour la plupart *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses. Contrairement à la chaîne $\alpha 1$, la chaîne $\alpha 5$ est exprimée dans la plupart des lignées cancéreuses quelque soit leur tissu d'origine (Tani et al., 1999). Un peptide correspondant à une séquence du domaine G de la chaîne $\alpha 5$ a été synthétisé. Ce peptide est capable de se lier au récepteur de surface CD44 (récepteur majeur de l'acide hyaluronique) de cellules cancéreuses provenant de mélanomes et de tumeurs coliques et inhibe de façon dominant-négative la croissance tumorale (Hibino et al., 2004). Ce peptide semble en fait empêcher la liaison de Fgf2 au CD44 et bloquer ainsi la bioactivité du facteur de croissance (Hibino et al., 2005). Une analyse *in vivo* de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans le cancer du poumon a plutôt révélé une chute de son expression dans les foyers tumoraux qui pourrait contribuer à la fragmentation de la lame basale et donc à l'invasion tumorale (Akashi et al., 2001). Un rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'invasion métastatique a été mis en évidence dans le cancer du sein. Contrairement aux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ de laminine, la chaîne $\alpha 5$ est exprimée dans les tumeurs du sein, qu'elles soient invasives ou non. Par contre, dans les tumeurs non ou peu invasives, son expression est périphérique et principalement localisée autour des vaisseaux de la tumeur, alors que dans les tumeurs invasives, la chaîne $\alpha 5$ est exprimée dans toute la tumeur. Ainsi l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au sein des tumeurs du sein semble corrélée à leur potentiel métastatique. Cette forte expression est maintenue dans les métastases pulmonaires et osseuses. Cependant, ces résultats ont été obtenus chez la souris et différent chez l'homme. Par ailleurs, la laminine-511 promeut l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*. Cette étude va en faveur d'une contribution de la chaîne $\alpha 5$ au processus métastatique (Chia et al., 2007).

IV. Les Récepteurs de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

Les laminines agissent sur les cellules par l'intermédiaire de **récepteurs membranaires**. Afin d'étudier le rôle biologique de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et d'en déterminer les bases moléculaires, il est important de connaître les récepteurs spécifiques auxquels elle se lie et de tenter de déterminer comment la cellule répond à ces interactions. De nombreuses molécules de surface ont été identifiées comme étant des récepteurs pour les laminines et autres composants de la lame basale. Ces récepteurs sont classiquement répertoriés en 2 classes : les récepteurs de type

intégrine et les récepteurs de type non-intégrine. Au vu de la spécificité d'action propre à chaque laminine et de l'ampleur des voies de signalisation pouvant découler de leur interaction avec leurs récepteurs, je m'attacherai ici à mentionner uniquement les récepteurs décrits pour se lier spécifiquement à la chaîne $\alpha 5$.

A. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β sans homologie, associées de façon non covalente [pour revue, voir : (Danen et al., 2003; Takada et al., 2007; Berman et al., 2003; Kumar, 1998)]. Elles constituent une large famille de glycoprotéines comptant 18 chaînes α et 8 chaînes β qui peuvent s'associer pour former les 24 intégrines identifiées à ce jour (figure 29). Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ sont exprimées par la plupart des types cellulaires, mais bien souvent l'expression des sous-unités d'intégrine est spécifique d'un type cellulaire ou d'un tissu donné. Chaque sous-unité correspond à un polypeptide transmembranaire de type I comportant donc une partie NH₂-terminale extracellulaire et une partie COOH-terminale intracellulaire, et contient 3 domaines : un domaine extracellulaire glycosylé qui représente 90% de la molécule, un domaine hydrophobe transmembranaire responsable de l'ancrage dans la membrane plasmique, et un domaine intracytoplasmique assez court (30-50 acides aminés) excepté pour la sous-unité $\beta 4$ (plus de 1000 acides aminés). Les domaines globulaires extracellulaires des 2 sous-unités comportent le site de liaison aux ligands qui reconnaît généralement les séquences RGD (Arg-Gly-Asp). La spécificité de liaison est également déterminée par la conformation adoptée individuellement par les sous-unités α et β et l'affinité pour un ligand est souvent dépendante d'un regroupement d'intégrines et est régulée par l'association des intégrines avec les éléments du cytosquelette. Les principaux ligands des intégrines sont des molécules de la matrice extracellulaire comme les laminines, le collagène, la fibronectine et la vitronectine. Mais certaines intégrines peuvent également lier des molécules solubles comme le fibrinogène et s'associer à des co-récepteurs de type ICAM par exemple. L'interaction avec les ligands requiert la liaison de cations bivalents tel que Mg^{2+} . La plupart des intégrines ont de l'affinité pour plusieurs ligands extracellulaires et un ligand donné peut souvent se lier à plusieurs intégrines.

Dans la conformation inactive d'une intégrine, les domaines globulaires extracellulaires sont dirigés vers la membrane plasmique de sorte qu'ils ne peuvent pas lier de ligand ou alors avec une très faible affinité. L'association des sous-unités α et β au niveau de leurs domaines cytoplasmiques permet le maintien de cet état inactif. Deux types de signaux régissent la fonction des intégrines : tout d'abord des signaux qui vont de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (« inside-out signaling ») et ensuite des signaux induits par des ligands extracellulaires qui vont de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (« outside-in signaling ») (figure 30). L'activation des intégrines et leur affinité pour des ligands sont régulées par la **signalisation « inside-out »**. En effet, la liaison de la taline au domaine cytoplasmique de la sous-unité β dissocie l'association des domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β et entraîne un changement conformationnel du domaine extracellulaire augmentant l'affinité du récepteur pour son ligand. Un réarrangement du cytosquelette va également pouvoir engendrer un regroupement focal de plusieurs intégrines permettant également d'augmenter l'affinité au ligand extracellulaire. Toutefois, cette signalisation « inside-out » peut aussi inhiber l'affinité du récepteur pour ses ligands, *via* des récepteurs couplés à une protéine G qui vont phosphoryler la sous-unité β , ce qui va empêcher sa liaison avec la taline et donc également les liaisons aux ligands extracellulaires. Cette régulation de l'affinité permet une modulation de la fonction biologique, par exemple en régulant la pénétration des leucocytes dans un tissu inflammé (une affinité modérée permettra le « rolling » des leucocytes sur la membrane endothéliale alors qu'une forte affinité permettra d'arrêter leur progression pour entamer la phase de diapédèse).

La **signalisation « outside-in »** est initiée par la liaison des ligands aux intégrines qui engendre l'**activation de voies de signalisation intracellulaires**. La liaison du ligand entraîne alors à son

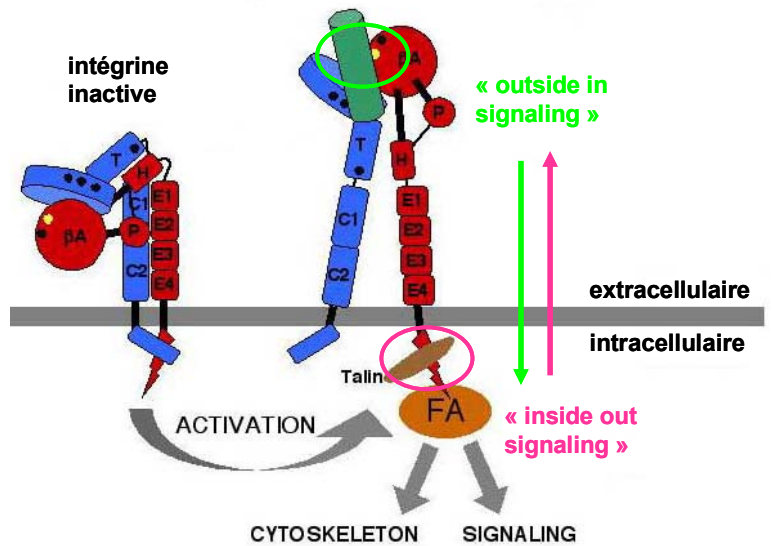
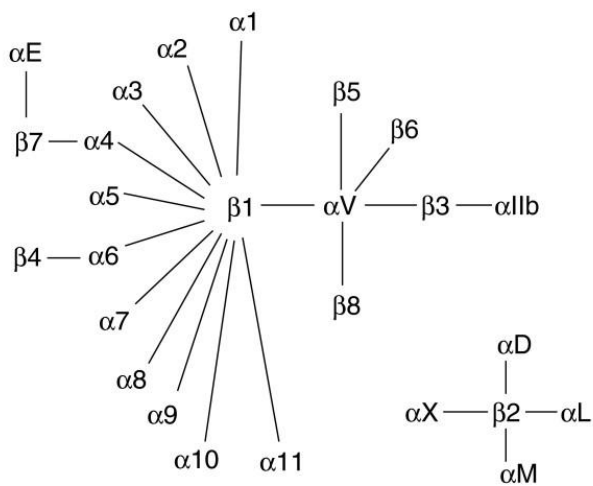


Figure 29 : Membres de la superfamille des intégrines

Figure 30 : Principe d'activation des intégrines

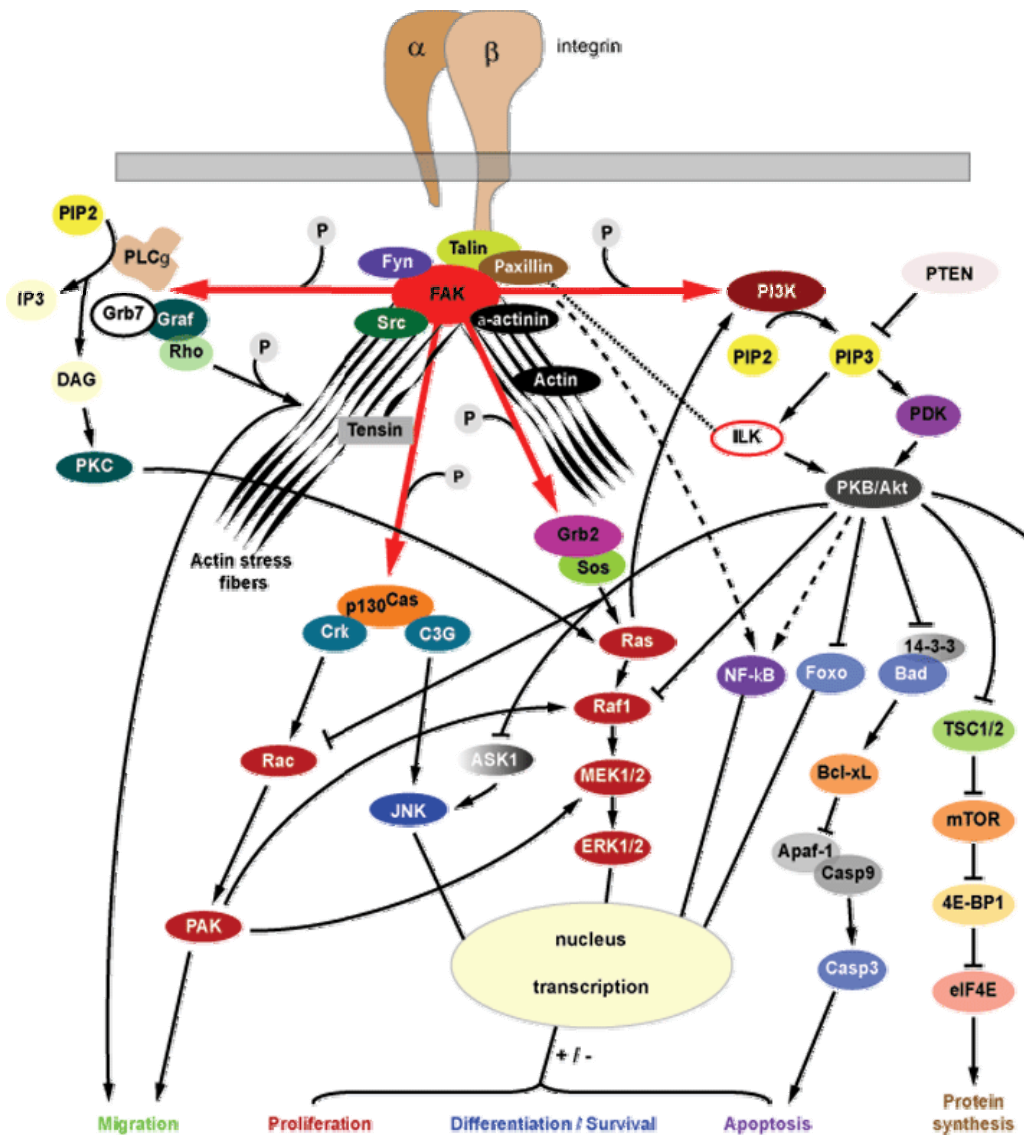


Figure 31: Diverses voies de signalisation peuvent être activées *via* les intégrines

tour une modification de la conformation de l'intégrine (séparation des chaînes α et β au niveau des domaines cytoplasmiques et transmembranaires) conduisant à l'interaction des domaines cytoplasmiques avec diverses molécules de signalisation intracellulaire, notamment des enzymes tel que **FAK** (focal adhesion kinase), **ILK** (integrin-linked kinase), et les GTPases **Ras** et **Rho** ou avec des protéines adaptatrices (Cas/Crk ou paxillin) (figure 31). FAK est l'élément central de la signalisation médiée via les intégrines. La phosphorylation de FAK à des sites spécifiques va dicter ses interactions avec des protéines en aval (Grb2, p130^{Cas}, PI3K, Graf) qui vont à leur tour induire des cascades de signalisation conduisant au contrôle de divers processus cellulaires. Les intégrines peuvent ainsi activer une large diversité de voies de signalisation intracellulaires différant selon le type d'intégrine, le type de ligand et le contenu cellulaire impliqués.

La chaîne $\alpha 5$ de laminine peut potentiellement lier les intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ étant ses récepteurs majeurs, ou du moins les plus étudiés. La double invalidation des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 6$ d'intégrine chez la souris engendre un phénotype similaire à celui des souris Lama5^{-/-}. Le fait que ces souris présentent une exencéphalie et une syndactylie comme les mutants Lama5^{-/-} alors que ce n'est pas le cas chez les simples mutants intégrine $\alpha 3$ ^{-/-} ou intégrine $\alpha 6$ ^{-/-}, suggèrent que l'interaction de la chaîne $\alpha 5$ de laminine avec ces deux sous-unités d'intégrines est essentielle au développement de certains tissus (De Arcangelis et al., 1999). Alors que l'invalidation des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 6$ d'intégrine engendre une létalité néonatale, l'invalidation de la sous-unité $\beta 1$ d'intégrine induit une létalité embryonnaire plus précoce à E5.5, montrant l'importance d'une autre sous-unité α d'intégrine pour le développement précoce. L'invalidation des sous-unités $\alpha 6$ ou $\beta 4$ d'intégrine induit une létalité néonatale associée à une épidermolyse bulleuse.

Concernant la **signalisation médiée par la chaîne $\alpha 5$ via les intégrines**, il a été montré que la laminine-511 augmente la **migration de cellules cancéreuses coliques** (LIM1215) stimulée par l'EGF *via* les **intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$** . Des anticorps bloquants dirigés contre ces intégrines permettent en effet d'inhiber la migration sur laminine-511 induite par l'EGF (Pouliot et al., 2001). Il a par ailleurs été montré que les laminines-511/521 induisent la migration cellulaire en activant **Rac** par la voie de signalisation **p130(cas)-CrkII-DOCK180** vraisemblablement *via* l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ (Gu et al., 2001). Une autre étude a montré que les laminines 511/521 augmentent la **prolifération** de cellules tumorales (ECV304) stimulée par le FGF2 ou par le VEGF, *via* l'intégrine **$\alpha v\beta 3$** (Genersch et al., 2003). La chaîne $\alpha 5$ de laminine serait également capable d'induire l'**activation de ERK** *via* l'intégrine **$\alpha 6\beta 1$** dans des cellules épithéliales pulmonaires (Ferletta et al., 2003).

B. Le dystroglycane

Le dystroglycane est un complexe d'adhésion formé par 2 sous-unités – l' α et le β -dystroglycane - qui sont codées par le même gène DAG1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)(figure 32). Le propeptide traduit subit en fait un clivage post-traductionnel aboutissant aux 2 sous-unités qui vont ensuite s'associer de manière non covalente. Le β -dystroglycane est une protéine transmembranaire de 43kDa et l' α -dystroglycane est une protéine extracellulaire fortement glycosylée par modification post-traductionnelle. Son degré de glycosylation varie selon les tissus conférant à l' α -dystroglycane un poids moléculaire oscillant entre 120 et 180 Kd [pour revue, voir : (Barresi et al., 2006;Winder, 2001;Winder, 2001)].

Le dystroglycane présente une large distribution lors du développement embryonnaire et chez l'adulte. Il est fortement exprimé dans le muscle squelettique, tissu dans lequel son rôle a été le plus étudié, mais aussi dans différents types cellulaires du système nerveux central, dans le système nerveux périphérique (membrane des cellules de Schwann), dans la rétine, et plus largement dans les cellules épithéliales.

Le dystroglycane est un élément pivot d'un complexe de glycoprotéines transmembranaires associées au cytosquelette (« dystrophin/utropin-associated glycoprotein complex » ou DGC) qui

participe à l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. C'est l' α -dystroglycane, de par ses sites de O-glycosylation concentrés en un domaine central de type mucine, qui lie de façon calcium-dépendante plusieurs molécules de la matrice extracellulaire, notamment plusieurs isoformes de laminines, en particulier celles contenant la chaîne $\alpha 5$, l'agrine et le perlecan. Le β -dystroglycane est lui connecté par son domaine cytoplasmique à la **dystrophine** dans le muscle squelettique ou à l'**utrophine**, un homologue ubiquitaire de la dystrophine, dans les autres tissus. La dystrophine ou l'utrophine sont elles ancrées dans le cytosquelette d'actine. Par ailleurs, le β -dystroglycane peut lier d'autres molécules du cytosquelette ou du cytosol, notamment la molécule de signalisation **Grb2** initiatrice de la cascade de signalisation **ERK-MAP kinase** (figure 32). Ces interactions confèrent au dystroglycane diverses fonctions en étant, par exemple, essentielle à **l'embryogenèse précoce**, à la **stabilité du sarcolemme** lors de la contraction musculaire, à la **morphogenèse des reins et des glandes salivaires** (Durbeej et al., 2001). Son invalidation génique chez la souris engendre une létalité embryonnaire précoce à E5,5 associée à un défaut de formation de la membrane de Reichert (Williamson et al., 1997). Le dystroglycane est également impliqué dans certaines pathologies telles que les **dystrophies musculaires**. L'invalidation conditionnelle de DAG1 dans le muscle murin engendre une dystrophie musculaire (Cohn et al., 2002) et des défauts de glycosylation pourraient en être la cause chez l'homme. L'invalidation d'un de ses principaux ligands, la chaîne $\alpha 2$ de laminine, engendre également une dystrophie musculaire. Des modifications d'expression du dystroglycane ont été observées dans des cancers du sein, de la prostate et du côlon et le dystroglycane peut être dégradé par des métalloprotéases. Concernant la **signalisation médiée par la chaîne $\alpha 5$ via l' α -dystroglycane**, bien que le β -dystroglycane puisse lier Grb2 et donc potentiellement activer ERK, une autre étude a montré que la liaison de la chaîne $\alpha 5$ de laminine au dystroglycane inhiberait l'activation de ERK induite par la liaison de cette même chaîne à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ (Ferletta et al., 2003).

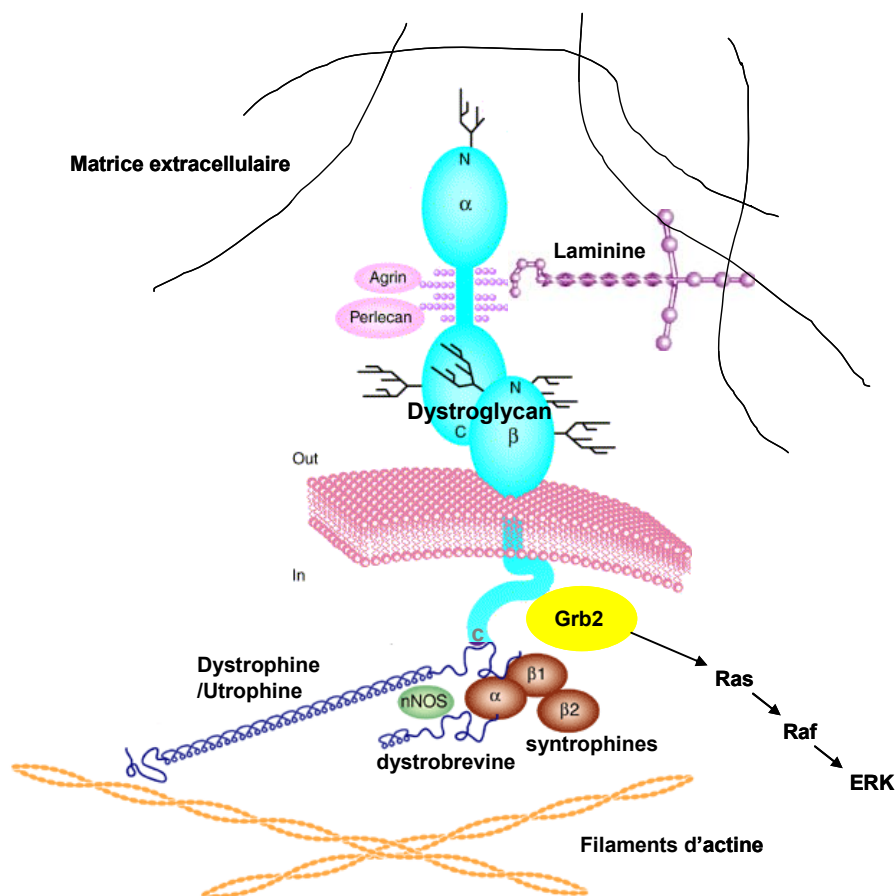


Figure 32: Le dystroglycane et ses ligands

C. Les syndécanes

Les syndécanes sont des **protéoglycanes membranaires à héparane sulfate** [pour revue, voir : (Fears et al., 2006; Delehedde et al., 2001)]. Les protéoglycanes sont des molécules constituées d'une protéine appelée « *protéine coeur* » sur laquelle sont greffées par covalence des branches polyosidiques sulfatées nommées GlycosAminoGlycanes (GAGs). Les syndécanes, protéines transmembranaires de type I, comportent un large domaine amino-terminal extracellulaire (ectodomaine), un domaine transmembranaire et un court domaine carboxy-terminal cytoplasmique. Le domaine extracellulaire peut être clivé et relargué dans la matrice extracellulaire (figure 33). Le domaine transmembranaire contient des régions qui interagissent avec d'autres protéines membranaires, notamment certaines intégrines afin de former un **complexe signalitique**. Des résidus glycines dispersés le long du domaine transmembranaire réguleraient l'oligomérisation des syndécanes. Le domaine cytoplasmique très court contient un domaine proximal C1 qui peut lier des éléments du cytosquelette tel que l'ezrin et, à l'extrémité carboxy-terminal, un domaine C2 qui peut lier les protéines contenant un domaine PDZ telle la syntenine. Le domaine cytoplasmique ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, mais il contient trois résidus tyrosines et une sérine conservés.

Chez les mammifères, la famille des syndécanes comprend quatre membres (syndécannes-1 à -4). Chez l'adulte, le syndécane-1 est majoritairement exprimé sur les cellules épithéliales, le syndécane-2 sur les cellules endothéliales et les fibroblastes, le syndécane-3 au niveau du système nerveux et le syndécane-4 est quant à lui retrouvé de façon plus ubiquitaire.

La fixation des ligands, notamment des molécules de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissances, aux syndécanes peut avoir plusieurs conséquences. Dans un premier temps, cette liaison augmente la concentration des ligands à la surface des cellules et permet donc une plus grande activation des récepteurs primaires de la signalisation. Dans un second temps, les syndécanes peuvent s'associer avec le cytosquelette d'actine et participer ainsi à la formation des adhésions focales et aux modifications de la morphologie cellulaire. Le rôle des syndécanes et celui des intégrines semblent se compléter, voire former un complexe signalitique entraînant une réorganisation du cytosquelette. En effet, des études ont montré que les intégrines permettraient l'attachement et l'étalement des cellules mais pas la formation des adhésions focales qui nécessite la participation des syndécanes. La possible participation du syndécane-4 dans la signalisation a été soulignée par sa présence dans les adhésions focales. De nombreuses évidences ont suggéré que le syndécane-4 pouvait réguler la signalisation par les GTPases de la famille Rho. La liaison du syndécane-4 permet aussi d'activer la protéine kinase C et de réguler la phosphorylation de la kinase de l'adhésion focale (FAK). Or, cette phosphorylation est un mécanisme qui dépend de l'activation de Rho.

Concernant la **signalisation spécifiquement médiée par la chaîne $\alpha 5$ via les syndécanes**, il a été montré que l'adhésion cellulaire à un peptide correspondant à la région du domaine LG4 de la chaîne $\alpha 5$ liant le syndécane-4 induit la **phosphorylation de FAK** (Lin et al., 2002).

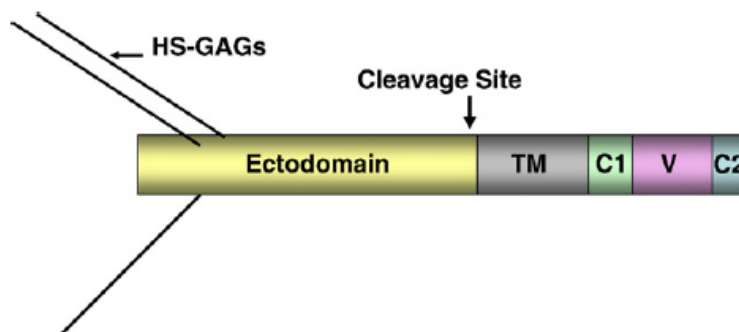


Figure 33: Représentation schématique d'un syndécane (Fears et al., 2006)

HS-GAG : héparane sulfate-glycosaminoglycanes

TM : domaine transmembranaire, C : régions conservées du domaine cytoplasmique, V : région variable.

D. Le Luthéran

Le Luthéran (Lu) est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des **immunoglobulines** [pour revue voir : (Eyler et al., 2006; Kikkawa et al., 2005)]. Contrairement aux intégrines et au dystroglycane qui peuvent lier les laminines mais également d'autres molécules de la matrice extracellulaire, le Luthéran est un récepteur **exclusif** des laminines et plus précisément des **laminines contenant la chaîne $\alpha 5$** . La synthèse d'une protéine recombinante (sol-Lu) correspondant aux domaines extracellulaires du Luthéran a en effet permis de montrer que le Luthéran se lie exclusivement à la chaîne $\alpha 5$ de laminine et que cette liaison n'est pas dépendante de cations bivalents (Kikkawa et al., 2002). Sol-Lu a été utilisée comme sonde pour révéler les liaisons du Luthéran *in vivo* sur des coupes de tissus. Alors que sol-Lu marque les lames basales exprimant la chaîne $\alpha 5$, il ne se lie pas au tissu $\alpha 5^{-/-}$, indiquant que le Luthéran ne se lie à aucune autre molécule de la matrice extra-cellulaire. De plus, l'expression du Luthéran est réduite ou délocalisée, selon les tissus, dans les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 5$ (Bolcato-Bellemin et al., 2003; Moulson et al., 2001) et augmentée dans les souris surexprimant cette chaîne (Moulson et al., 2001).

Le gène codant pour le Luthéran comporte 15 exons et va en fait permettre la traduction de 2 protéines résultant d'un épissage alternatif : le Luthéran (85kDa) et B-CAM (78kDa) qui diffère du Luthéran par l'absence des 40 acides aminés au niveau COOH-terminal du domaine cytoplasmique. La portion extracellulaire du Lu/B-CAM comporte 2 domaines variables suivis de 3 domaines constants de type-immunoglobuline (figure 34). Une glycosylation du Luthéran est requise pour une conformation adéquate à la liaison avec les laminines. La portion cytoplasmique comporte un motif SH3 de liaison et des potentiels sites de phosphorylation sérine/thréonine, absents dans la protéine tronquée B-CAM, conférant au Luthéran une probable fonction signalitique. Un ligand intracellulaire, la spectrine, a été identifié et se lie au domaine cytoplasmique du Luthéran dans les érythrocytes (Kroviarski et al., 2004). Le Luthéran humain et son homologue chez la souris partagent 72% d'homologie. Dans les deux espèces, le Luthéran est exprimé lors du **développement fœtal** et **chez l'adulte dans de nombreux tissus** incluant le placenta, le foie, le rein, les follicules pileux, le cœur, les poumons ; il est trouvé généralement au niveau basal des cellules épithéliales et dans les cellules musculaires en regard des lames basales exprimant la chaîne $\alpha 5$ de laminine. L'expression de B-CAM est réduite par rapport à celle du Luthéran chez l'homme et indétectable chez la souris (Rahuel et al., 1999; Moulson et al., 2001).

Chez l'homme, le Luthéran est important pour l'adhésion des globules rouges à la lame basale sous-endothéliale. Dans les cas d'anémie falciforme, le Luthéran des globules rouges voit son affinité augmenter pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine, et cette augmentation d'affinité semble être corrélée à l'élévation β -adrénergique du taux d'AMPC impliquant la protéine kinase A. Le Luthéran pourrait également jouer un rôle dans la progression tumorale. En effet une surexpression a été observée dans les carcinomes ovariens et dans des dysplasies épidermiques. Mais les fonctions du Luthéran, et notamment son rôle signalitique, ont été très peu étudiées. Au cours de mon doctorat, j'ai contribué à l'analyse des souris invalidées pour le Luthéran. Les résultats de cette étude seront présentés dans la 2^{ème} partie des Résultats.

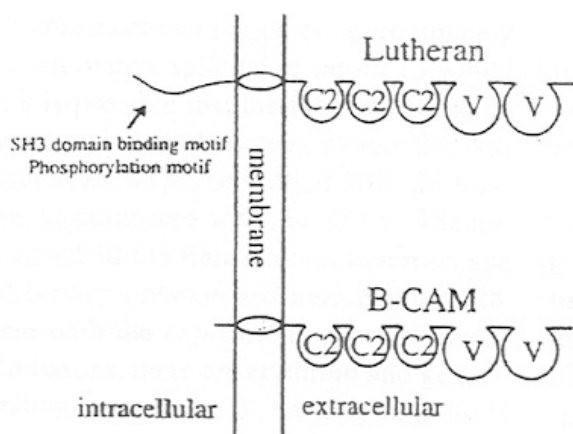


Figure 34: Représentation schématique du Luthéran et de B-CAM (Kikkawa et al., 2005)

V : domaine de type immunoglobuline variable. C : domaine de type immunoglobuline constant

E. Domaines de liaison de la chaîne $\alpha 5$ avec ses récepteurs

Nous avons vu précédemment que la chaîne $\alpha 5$ de laminine peut se lier à de nombreux récepteurs de type intégrine ou non-intégrine. Différentes études ont permis d'identifier les sites d'interactions mis en jeu, qui se situent principalement sur trois régions de la chaîne $\alpha 5$ (figure 35).

1. Sites d'interaction sur le domaine G de la région COOH-terminale

Des tests d'adhésion cellulaire sur des peptides recombinants recouvrant le domaine G de la chaîne $\alpha 5$ ont montré que les domaines LG de la chaîne $\alpha 5$ présentent une force d'adhésion différente, dont la répartition sur le domaine G varie suivant le type cellulaire. De plus ces différents sites d'adhésion induisent des effets biologiques distincts comme l'atteste l'obtention de morphologies cellulaires différentes.

L'adhésion de cellules épithéliales au fragment $\alpha 5$ LG1-3 est totalement inhibée par un anticorps bloquant dirigé contre la sous-unité $\beta 1$ d'intégrine, partiellement inhibée par un anticorps anti- $\alpha 3$ ou anti- $\alpha 6$ d'intégrine. Par contre aucun anticorps anti-intégrine n'inhibe la liaison des cellules au fragment $\alpha 5$ LG4-5 (Yu et al., 2003). Cela démontre que **les intégrines lient le segment LG1-3 du domaine G de la chaîne $\alpha 5$** et que plusieurs isoformes d'intégrine, ici les **intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$** , participent à cette interaction. Il semblerait toutefois que la conformation spatiale de la laminine, donnée par l'association des chaînes β et γ avec la chaîne α soit nécessaire à cette liaison (Ido et al., 2006).

La protéine recombinante sol-Lu, correspondant au domaine extracellulaire du Luthéran, ne se lie pas au tissu musculaire squelettique où la chaîne $\alpha 5$ est dépourvue des domaines LG4-5. Par ailleurs, sol-Lu se lie au tissu musculaire exprimant une chaîne α chimère $N\alpha 5+\alpha 1$ (LG4-5) mais pas à celui exprimant la chimère $N\alpha 5+\alpha 1$ (LG3-5), ce qui indique que le **Luthéran se lie au domaine LG3 de la chaîne $\alpha 5$** mais que les domaines LG4 et LG5 sont nécessaires pour donner une conformation adéquate à cette liaison (Kikkawa et al., 2002).

L' α -dystroglycane permet, lui, l'adhésion cellulaire sur le segment LG4-5. En effet, du dystroglycane purifié ne lie pas le segment $\alpha 5$ LG1-3 mais par contre se lie au fragment $\alpha 5$ LG4-5. Cette liaison nécessite la conformation du tandem LG4-LG5 car les fragments LG4 et LG5 seuls ne permettent pas la liaison (Yu et al., 2003).

Le module $\alpha 5$ LG4-5 interagit également avec un récepteur contenant des chaînes d'héparane sulfate non identifié par les auteurs (Nielsen et al., 2000). L'héparine, analogue de l'héparane sulfate, inhibe en effet la liaison des cellules à des peptides du domaine LG4-5 de la chaîne $\alpha 5$ suggérant que des **syndécanes** peuvent se lier à ce niveau (Makino et al., 2002).

L'adhésion des cellules à la chaîne $\alpha 5$ se fait sur plusieurs sites distincts car la combinaison des fragments $\alpha 5$ LG1-3 et $\alpha 5$ LG4-5 ne permet pas la même efficacité d'adhésion que la laminine 511/521 intacte (Yu et al., 2003). Cela suggèrent l'existence d'autres sites de liaison sur d'autres domaines que le domaine G.

2. Sites d'interaction au niveau NH_2 -terminal

La construction d'un domaine $\alpha 5$ VI recombinant a permis en effet de démontrer **une adhésion cellulaire sur le domaine VI de la chaîne $\alpha 5$** (Nielsen et al., 2001). La synthèse de peptides recouvrant ce domaine VI a permis d'identifier 2 peptides impliqués dans cette adhésion. Des expériences de mutagenèse ont révélé l'importance de certains acides aminés (Tyr130, Arg225, Lys229 et Arg239) pour l'adhésion. L'héparine est capable d'inhiber à 80% la liaison cellulaire au domaine VI, suggérant la potentielle liaison de syndécanes à ce niveau. Cependant la liaison à l'héparine n'est pas perturbée par la mutation des 4 acides aminés cités précédemment, ce qui

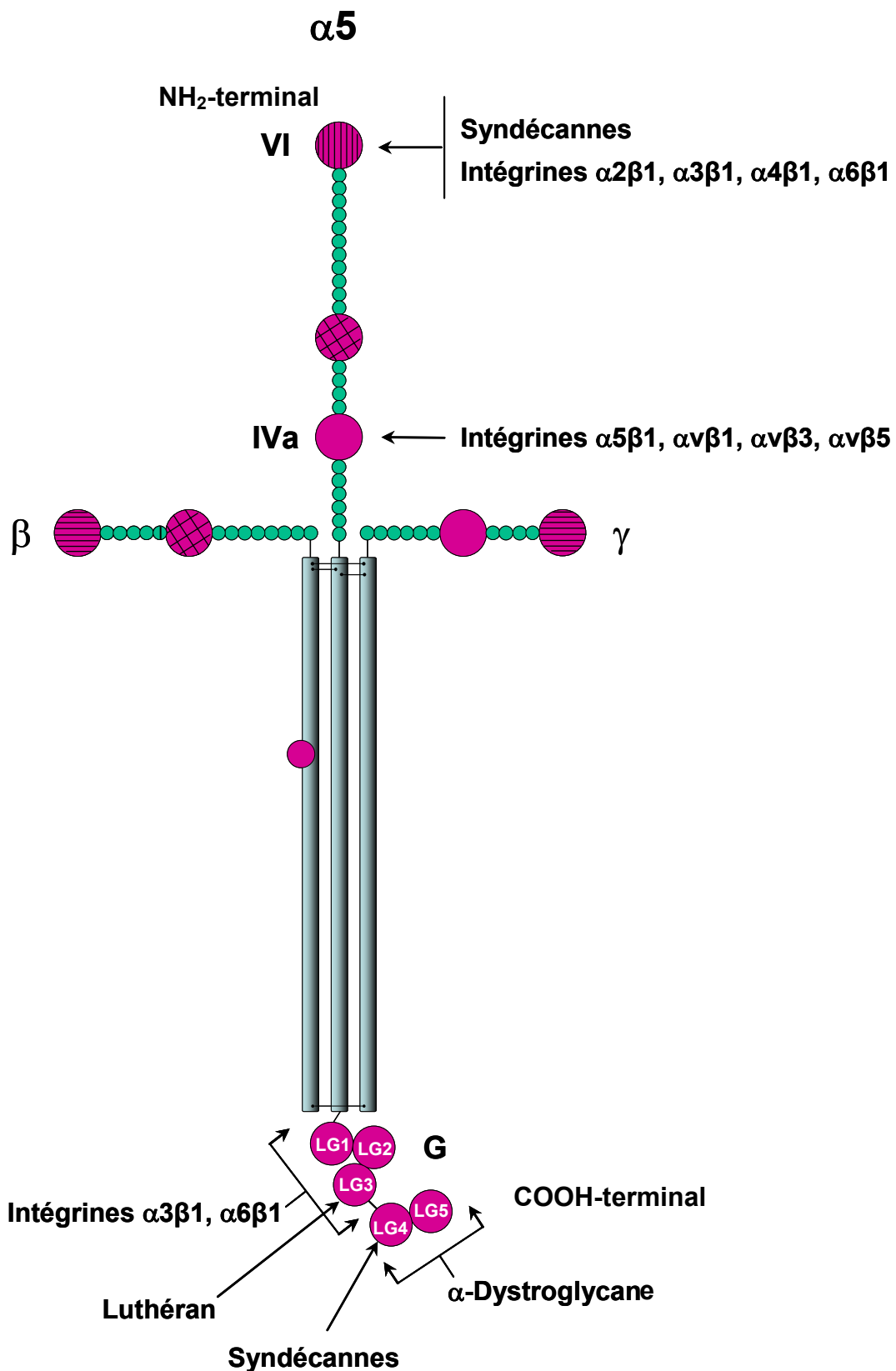


Figure 35: Les sites d'interaction de la chaîne $\alpha 5$ avec ses récepteurs.

Les sites précis de liaison des intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ sur la chaîne $\alpha 5$ de laminine n'ont pas été définis. Par analogie avec la laminine-111, on peut présumer que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ se lie au niveau du domaine G.

indique la participation d'un autre récepteur que les protéoglycanes. Des anticorps anti-intégrine $\alpha 3$ ou $\beta 1$ inhibent très fortement la liaison des cellules au domaine $\alpha 5$ VI. Les anticorps anti-intégrine $\alpha 2$, $\alpha 4$ ou $\alpha 6$ inhibent partiellement cette liaison. **L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ ainsi que les intégrines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$** avec une plus faible affinité peuvent donc lier le domaine NH2-terminal de la chaîne $\alpha 5$ de laminine. Un **syndécanes** pourrait y jouer le rôle de corécepteur.

3. Sites d'interaction du domaine IVa

Le domaine IVa de la chaîne $\alpha 5$, contenant 2 séquences RGD, peut également contribuer à l'adhésion de différents types cellulaires. Des anticorps anti-intégrines $\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, αv ou $\alpha 5$ inhibent au moins partiellement la liaison de certains types de cellules à un domaine $\alpha 5$ IVa recombinant, alors que les anticorps anti-intégrines $\alpha 3$ ou $\alpha 6$ n'ont pas d'effet. De plus, un peptide bloquant les sites RGD inhibe totalement ces liaisons démontrant que **l'adhésion cellulaire au domaine IVa de la chaîne $\alpha 5$ se fait par les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ et potentiellement $\alpha v\beta 1$ $\alpha v\beta 3$** sur les 2 séquences RGD (Sasaki et al., 2001).

OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT

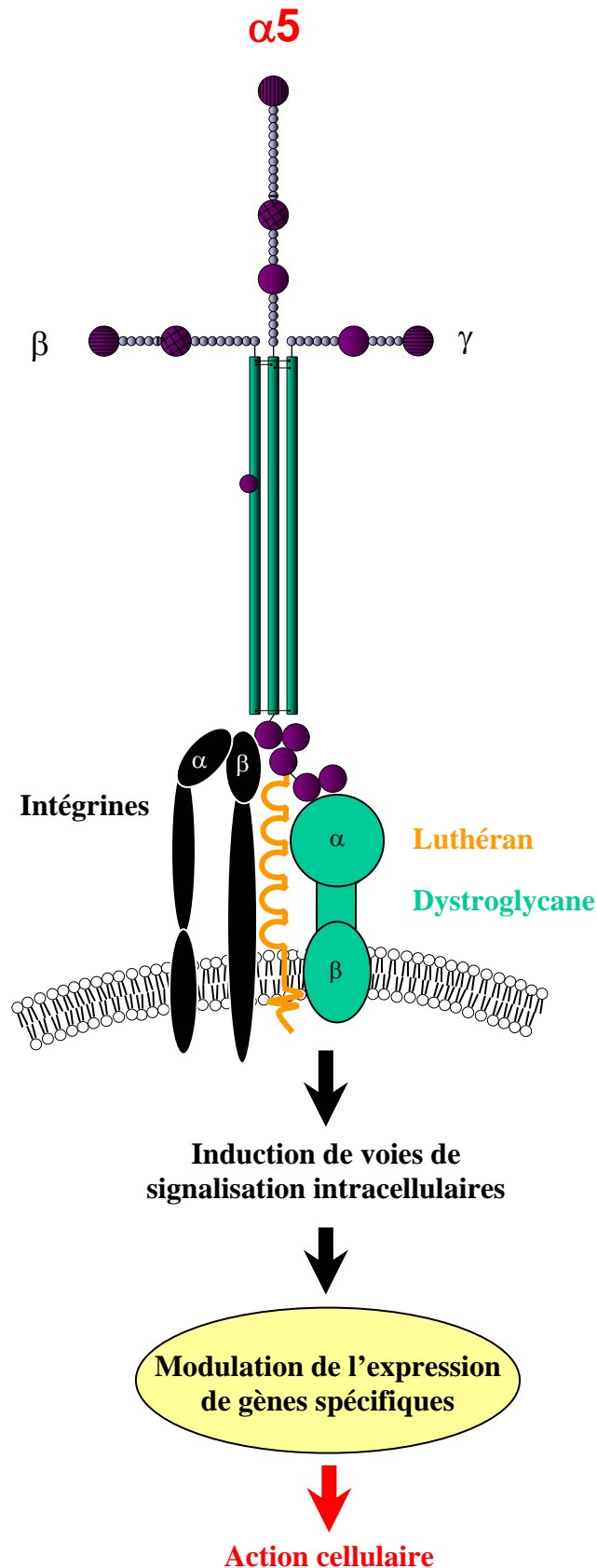


Figure 36: Modèle schématique et simplifié du mode d'action de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

La chaîne $\alpha 5$ est susceptible d'induire, *via* ses récepteurs, diverses voies de signalisation intracellulaires pour moduler à distance l'expression de gènes spécifiques et avoir un impact sur des fonctions cellulaires.

Vu la large expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les tissus embryonnaires et adultes et les anomalies engendrées par l'absence de chaîne $\alpha 5$ dans les souris invalidées, il apparaît que cette chaîne est essentielle au développement embryonnaire et à l'intégrité des tissus matures. Nous avons en effet pu constater, au cours de cette introduction, que la chaîne $\alpha 5$ de laminine est une molécule extracellulaire impliquée dans la morphogenèse de plusieurs organes et structures (placenta, rein, membres, poumon, dents, glandes salivaires, système nerveux, intestin), notamment dans l'arborescence tissulaire (réseau vasculaire placentaire, uretère, glandes sous-maxillaires), dans la division tissulaire (séparation des doigts et lobes pulmonaires), dans la cytodifférenciation (podocytes et cellules mésangiales, cellules épithéliales pulmonaires, cellules épithéliales dentaires, et cellules musculaires lisses intestinales), dans les processus d'extension de la membrane plasmique (podocytes), et dans l'homéostasie des organes matures (rein, poumon, système nerveux).

La chaîne $\alpha 5$ n'est donc pas une simple molécule de soutien ou de charpente cellulaire mais s'avère être une molécule **active** qui peut dicter le devenir des cellules. **Notre hypothèse est que la chaîne $\alpha 5$ pourrait jouer le rôle de molécule « signal » en activant ou en réprimant, via ses récepteurs membranaires, des voies de signalisation intracellulaires et ainsi moduler à distance l'expression de gènes spécifiques (figure 36).** En effet, bien que plusieurs isoformes de laminine puissent lier un même récepteur membranaire au sein d'un même tissu, je pense que la co-expression de différentes isoformes de laminine au sein d'une même lame basale n'est pas sans raison, et que chacune a une fonction signalétique distincte et bien spécifique. Nous avons vu dans l'introduction que cela a été prouvé par plusieurs études. Un autre exemple est que l'utilisation d'anticorps anti-intégrine $\alpha 3$ ou intégrine $\beta 1$ permet d'inhiber totalement la liaison de cellules tumorales pulmonaires (A549) aux laminines 511/521 ou 332. Les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 5$ lient donc un même et unique récepteur, l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, sur ces cellules. Pourtant ces deux isoformes de laminines engendrent une morphologie cellulaire différente, ce qui suggère qu'un même récepteur est capable de médier une signalisation intracellulaire différente selon l'isoforme de laminine initiatrice du signal (Kikkawa et al., 1998). Cela pourrait s'expliquer soit par une différence d'affinité qui déterminerait par la suite la force du signal cytoplasmique, soit par la participation de corécepteurs spécifiques à chaque ligand, ou encore par un changement de conformation du récepteur différant selon l'isoforme de laminine liée, qui engendrerait l'interaction de la partie cytoplasmique du récepteur avec des acteurs intracellulaires bien prédéterminés.

Nous avons également pu voir dans cette introduction que la chaîne $\alpha 5$ de laminine a des fonctions et des actions qui peuvent être différentes selon les tissus et les stades observés. Bien sûr, l'équilibre physiologique d'un tissu dépend également du répertoire de récepteurs membranaires qui y est présent et de l'influence de l'ensemble du microenvironnement qui lui est spécifique. Ainsi, je pense que le rôle signalétique de la chaîne $\alpha 5$ est particulier à chaque tissu car il dépend de l'influence de tout l'environnement tissulaire. Ainsi, si sa fonction biologique sur un type cellulaire ou dans un tissu donné a déjà été déterminée, il n'est pas forcément extrapolable à un autre tissu, et c'est pourquoi je pense qu'il est important de redéfinir son action et ses partenaires pour chaque type cellulaire ou tissu étudié.

Notre laboratoire s'intéresse particulièrement au tissu intestinal. Au vu du phénotype intestinal des souris Lama5^{-/-} qui avait été démontré dans notre groupe (Bolcato-Bellemin et al., 2003), la chaîne $\alpha 5$ de laminine semblait jouer un rôle clé dans la morphogenèse et la cytodifférenciation intestinales.

L'objectif de mon travail de doctorat a été d'identifier les voies de signalisation induites et les gènes cibles régulés par la chaîne $\alpha 5$ de laminine afin d'élucider les bases moléculaires du rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement et la fonctionnalité de l'intestin normal ainsi que dans l'intestin pathologique.

Pour ce faire, j'ai effectué une recherche à grande échelle des gènes cibles de la chaîne $\alpha 5$ et déterminé certaines voies de signalisation qui aboutissent à cette régulation génique.

Cette étude des mécanismes fondamentaux m'a permis d'aborder les possibles dérégulations qui pourraient être à l'origine ou du moins contribuer au développement de pathologies intestinales. En effet, je suis persuadée qu'un environnement bien équilibré est essentiel au bon fonctionnement du tissu. Il est facilement imaginable que, si le microenvironnement cellulaire est perturbé et si les interactions entre ce microenvironnement et notamment la chaîne $\alpha 5$ de laminine avec ses récepteurs cellulaires se dérèglent, cela peut avoir des conséquences néfastes sur la santé. J'ai eu l'opportunité, durant mon doctorat, de pouvoir collaborer avec les Services de pédiatrie du CHU de Strasbourg–Haute-pierre et de l'hôpital Necker de Paris pour analyser le rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, et également des autres isoformes de laminine, dans la maladie de Hirschsprung. Par ailleurs, les résultats que j'ai obtenus dans l'identification des voies de signalisation et des gènes cibles régulés par la chaîne $\alpha 5$, m'ont amenée à penser que la chaîne $\alpha 5$ pourrait être impliquée dans la tumorigenèse colique. J'ai donc débuté l'analyse de son potentiel rôle dans le cancer de l'intestin.

De plus, j'ai collaboré, durant mon doctorat, avec deux équipes de recherche ayant une thématique proche afin, d'une part d'étudier le rôle d'un récepteur spécifique de la chaîne $\alpha 5$, le récepteur Luthéran, et d'autre part de réaliser une étude différentielle de l'expression génique dans l'intestin, entre les stades adulte et embryonnaire et entre les 2 compartiments qui composent l'intestin.

Les résultats de mon travail de thèse sont présentés en 5 parties :

- Recherche des gènes cibles et des voies de signalisation régulés par la chaîne $\alpha 5$ de laminine et détermination de son rôle biologique dans l'intestin
- L'inactivation génique d'un récepteur de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, le Luthéran, engendre des anomalies rénale et intestinale chez la souris
- Caractérisation d'anomalies d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la maladie de Hirschsprung
- Analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les carcinomes coliques
- Identification des facteurs de transcription essentiels à la différenciation épithéliale de l'intestin

RÉSULTATS

1^{ère} Partie :

**Recherche des gènes cibles et des voies de signalisation
régulés par la chaîne $\alpha 5$ de laminine et détermination
de son rôle biologique dans l'intestin**

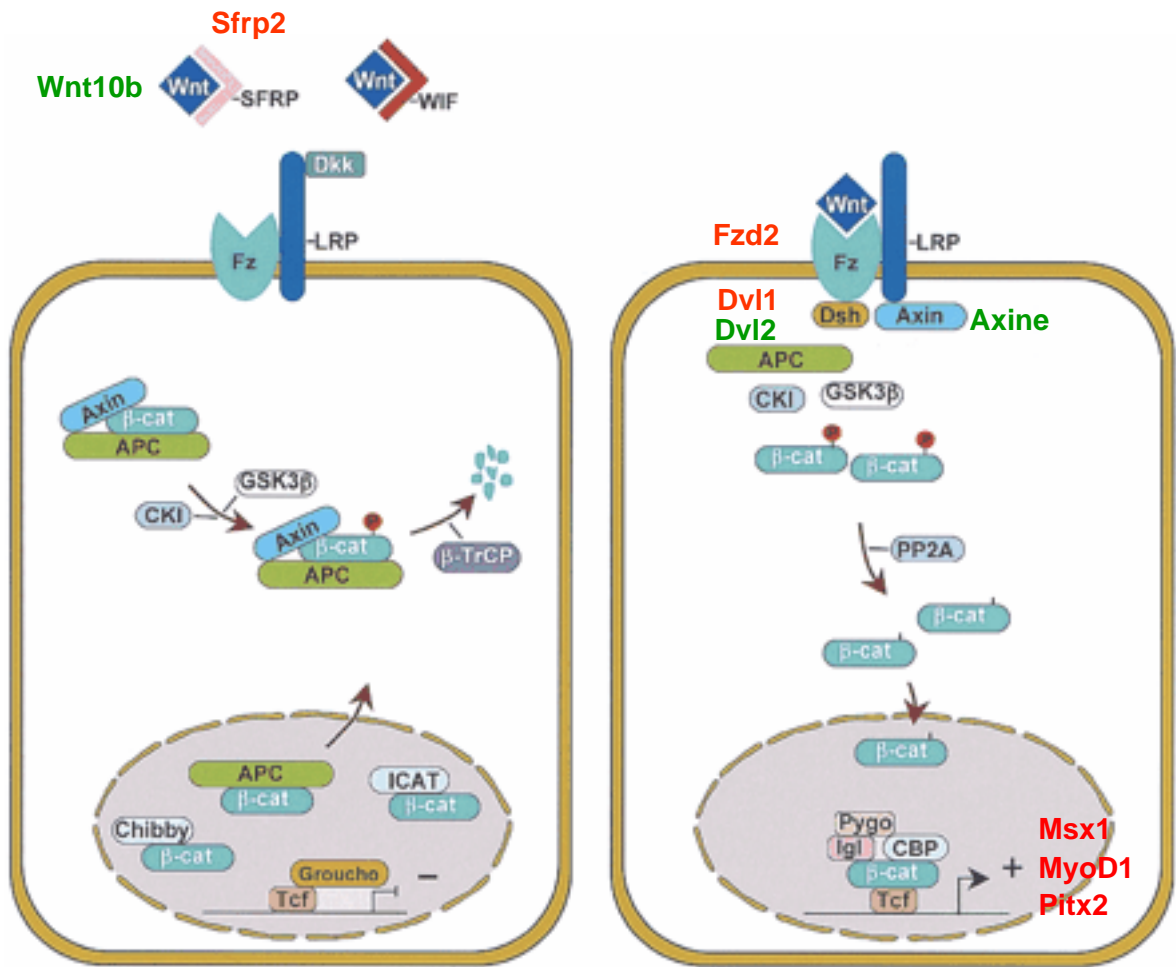


Figure 37 : La voie de signalisation canonique Wnt (Gregorieff et Clevers, 2005)

Une fois sécrétée, la protéine Wnt (19 isoformes connues chez la souris), peut interagir avec des récepteurs membranaires (Frizzled et LRP). Cette interaction, qui peut être inhibée par des facteurs tels que SFRP, WIF et Dickkopf (DKK), permet la déstabilisation - via l'intermédiaire Dishevelled - du complexe cytoplasmique de dégradation de la β -caténine. Ce complexe est formé par 3 protéines principales : l'axine, la GSK3 β et APC. En l'absence de signal Wnt, l'axine et APC forment un échafaudage qui permet à la GSK3 β de phosphoryler spécifiquement la β -caténine. Cette phosphorylation oriente la β -caténine vers l'ubiquitination, conduisant à sa dégradation par le protéasome. En présence de Wnt, ce complexe est déstabilisé ce qui entraîne une inhibition de la dégradation de la β -caténine et son accumulation cytoplasmique : la β -caténine peut alors gagner le noyau où elle se lie au complexe TCF/LEF. Cette liaison permet l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie Wnt, gènes impliqués notamment dans le contrôle du cycle cellulaire.

Les éléments de cette voie trouvés dérégulés dans notre analyse étaient les suivants : Wnt 10b, axine, dvl2, sous-exprimés, en vert. Sfrp2, inhibiteur soluble de la voie Wnt, Dvl1 et Fzd2 ont été trouvés sur-exprimés ainsi que les 3 gènes cibles de la voie Wnt : Pitx2, Msx1, MyoD1 (en rouge).

Recherche des gènes cibles et des voies de signalisation régulés par la chaîne $\alpha 5$ de laminine et détermination de son rôle biologique dans l'intestin

I. Base du travail

La première étape de mon travail de thèse a été de rechercher les **gènes cibles de la chaîne $\alpha 5$** de laminine. Nous avons pour cela choisi d'utiliser une stratégie innovante, au début de mon doctorat, qui est l'**hybridation différentielle sur puce à ADNc** dans le but de comparer les transcriptomes d'intestins embryonnaires (E15,5) de souris sauvages et de souris invalidées pour la chaîne $\alpha 5$. Le fait qu'au sein d'un même tissu, deux embryons mutants provenant d'une même portée présentent des différences de sévérité phénotypique a représenté une difficulté pour cette recherche des gènes régulés par la chaîne $\alpha 5$ qui peuvent donc sensiblement varier d'un individu à l'autre. L'identification des gènes cibles a ensuite permis de rechercher les **voies de signalisation induites par la chaîne $\alpha 5$** et qui aboutissent à cette régulation génique. Les **fonctions biologiques** en aval de cette signalisation ont ensuite été déterminées. Le tissu intestinal étant composé de 2 compartiments tissulaires –l'endoderme et le mésenchyme-, il a été important de tenter de dissocier les actions de la chaîne $\alpha 5$ propres à chaque compartiment.

II. Résumé des résultats

L'analyse transcriptomique a mis en évidence la **diminution de l'expression de gènes de différenciation épithéliale et musculaire en absence de chaîne $\alpha 5$ de laminine**. J'ai ainsi pu confirmer, au niveau moléculaire, le phénotype musculaire des intestins de souris $\alpha 5^{-/-}$ au vu de la diminution de l'expression de gènes impliqués dans les processus de différenciation du muscle ou d'activation de sa contraction, tels la desmine, Fhl1, le récepteur de la cholécystokinine A, et le neuropeptide Y. De plus, bien qu'aucune modification de la structure villositaire de l'intestin n'ait été observée, j'ai démontré l'implication de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le développement fonctionnel de l'intestin. En effet, l'absence de chaîne $\alpha 5$ engendre une sous-expression de gènes impliqués dans la fonction épithéliale, notamment Fabp1, Fabp2 et ApoA1, ApoA4 et Hmgcs2, acteurs du métabolisme des acides gras et du cholestérol et une chute d'expression des gènes codant pour les enzymes digestives Méprine1A et Dipeptidylpeptidase 4. L'absence de chaîne $\alpha 5$ entraîne par ailleurs une sur-expression de molécules d'adhésion telles les sous-unités αM , αV et $\beta 4$ d'intégrines et le récepteur 67 kD de la laminine-111. Or les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_6\beta_4$ sont des récepteurs de la laminine-511. Ces modifications suggèrent la mise en place, par la cellule, d'un phénomène de compensation de l'absence de signal de la laminine-511 par la **sur-expression de certains de ses propres récepteurs ou de récepteurs pour d'autres molécules de la matrice extracellulaire**.

Les expressions de gènes impliqués dans 2 voies de signalisation, les voies Wnt (figure 37) et PI3K/Akt (figures 38, 39, 40), ont été trouvées dérégulés par l'absence de chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin. Concernant la voie **Wnt**, la sur-expression de l'inhibiteur Sfrp2 et des gènes cibles Pitx2, Msx1, MyoD1 a été confirmée par RT-PCR quantitative, hybridation *in situ* ou immunofluorescence. Cette dérégulation est soit épithéliale soit musculaire selon le gène étudié. Ces résultats suggèrent une potentielle répression de la voie Wnt par la chaîne $\alpha 5$. Pour la voie **PI3K/Akt**, l'absence de chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin embryonnaire entraîne une altération de l'expression de *rasgrp2*, *pi3kcd*, *pikc2g* et une diminution de l'expression et de l'activation d'Akt, notamment au niveau du mésenchyme. Dans des cellules intestinales adultes, j'ai montré que la laminine-511 active spécifiquement Akt, *via* la PI3K, dans les cellules épithéliales, et non pas dans les cellules musculaires lisses. Cette activation se traduit par un changement morphologique des cellules épithéliales intestinales attribuant à la chaîne $\alpha 5$ un rôle fonctionnel sur le devenir cellulaire. Des tests de prolifération par incorporation de BrdU ont en effet révélé

l'effet positif de la laminine-511 sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales m-IC₁₂. J'ai également montré que **la laminine-511 induit la migration des cellules épithéliales** intestinales. Compte tenu de l'implication d'Akt dans la survie cellulaire, des tests de survie ont été réalisés sur ces cellules épithéliales. Ainsi, j'ai pu démontrer que la laminine-511 prévient l'apoptose des cellules induite par un traitement à l'H₂O₂. La wortmaninne inhibe totalement cet effet anti-apoptotique de la laminine-511, ce qui démontre que **la laminine-511 promeut la survie cellulaire via l'activation d'Akt**.

Ces résultats ont mis en évidence le rôle clé de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la différenciation non seulement musculaire, mais aussi épithéliale de l'intestin. Par le contrôle de voies de signalisation spécifiques, la chaîne $\alpha 5$ est capable de réguler l'expression de gènes cibles lui conférant un rôle varié dans les phénomènes de prolifération, de survie, de migration et de différenciation cellulaire.

Les résultats détaillés de cette étude sont présentés dans la publication 1 et dans les résultats complémentaires à cette publication :

- **Identification of laminin $\alpha 5$ gene signature in developing intestine: L. Ritié, C. Spenlé, J. Lacroute, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, Michèle Kedingner, Gertraud Orend, A-L. Bolcato-Bellemin, P. Simon-Assmann - Soumis à *Molecular Biology of the Cell* - **page 90****
- **Résultats complémentaires - page 127**

Avant la présentation de ces résultats, je vous présenterai quelques points méthodologiques importants pour cette étude, soit de façon plus détaillée que ceux indiqués dans la publication, ou liés aux résultats complémentaires, soit afin de définir clairement les stratégies expérimentales que j'ai employées.

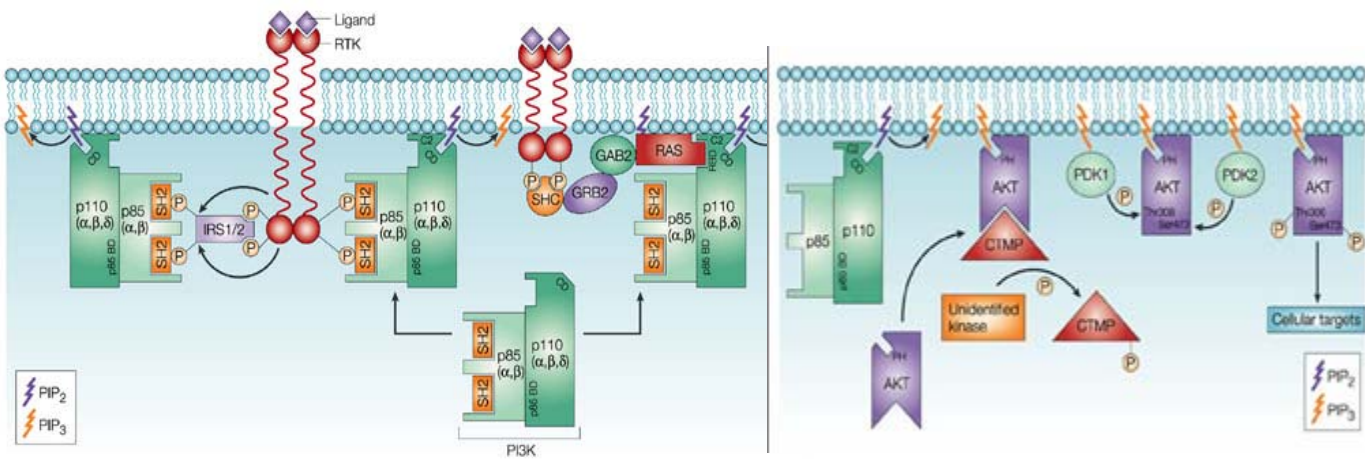


Figure 38 : Mécanisme d'activation d'Akt (Vivanco et Sawyers, 2002)

Voici le mécanisme le plus connu et le plus classique, d'activation d'Akt, en l'occurrence par la PI3Kinase. La PI3K est une molécule hétérodimerique. Sa sous-unité catalytique p110 permet la phosphorylation et donc la conversion de PIP₂ (phosphoinositole diphosphate) en PIP₃. Pour pouvoir transformer son substrat, PI3K doit être recruté au niveau de la membrane plasmique. C'est à ce niveau que sa sous-unité régulatrice p85 intervient. p85 contient 2 domaines SH2 qui vont lui permettre d'interagir directement avec les résidus phospho-tyrosines des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) ou avec des protéines adaptatrices IRS (insulin receptor substrate). Donc l'activation des RTK par des ligands α comme l'EGF ou l'insuline va permettre non seulement le recrutement de PI3K à la membrane mais cette liaison par le domaine SH2 va entraîner un changement de conformation de la sous-unité régulatrice, ce qui va laisser libre d'action la sous-unité catalytique pour transformer le PIP₂ en PIP₃. Akt est une serine thréonine kinase qui possède au niveau NH₂-terminal un domaine PH (plekstrin homology), un domaine catalytique au centre et un domaine régulateur en COOH-terminal. Pour être activé, Akt doit être recruté à la membrane plasmique et être phosphorylé au niveau de la thréonine 308 qui se trouve dans le domaine kinase, et au niveau de la sérine 473 au niveau du domaine régulateur. Akt est recruté à la membrane de par l'interaction de son domaine PH avec PIP₃ formé grâce à l'activation de la PI3K. Au niveau de la membrane, Akt est lié au niveau de son domaine régulateur à un modulateur appelé CTMP (« carboxy-terminal modulator protein ») qui empêche sa phosphorylation. La phosphorylation de CTMP inhibe son interaction avec Akt qui peut alors être phosphorylé sur la thréonine 308 par une autre sérine threonine kinase nommée PDK1 également liée à la membrane plasmique par un domaine PH. Le mécanisme de phosphorylation de la sérine 473 n'est pas encore connu.

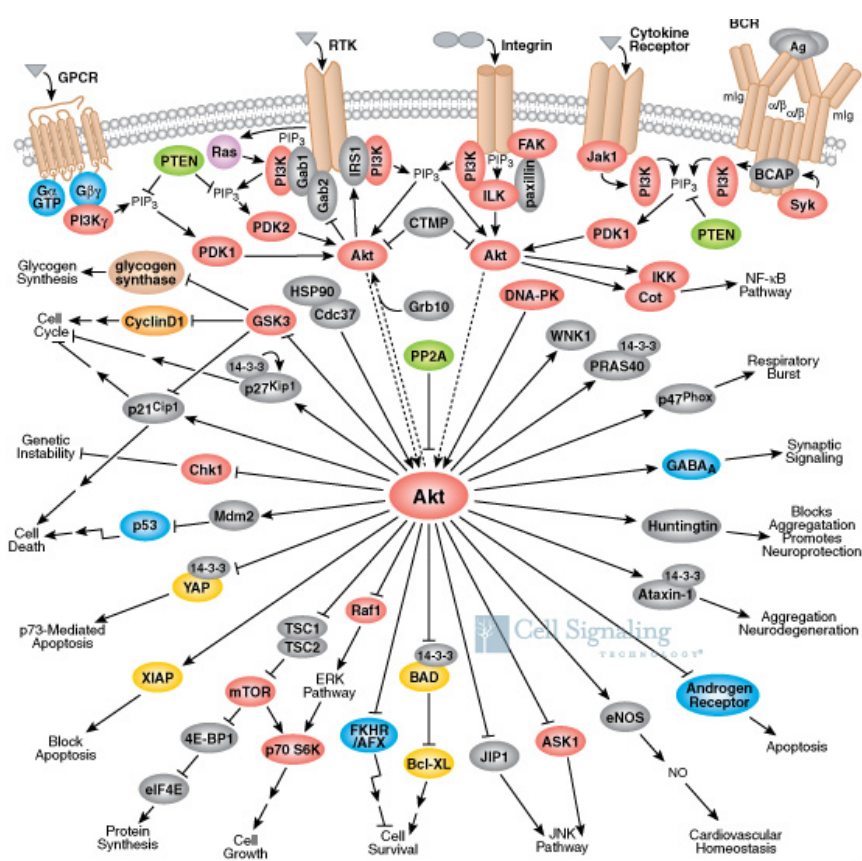


Figure 39 : Schéma montrant les nombreux substrats que Akt peut phosphoryler

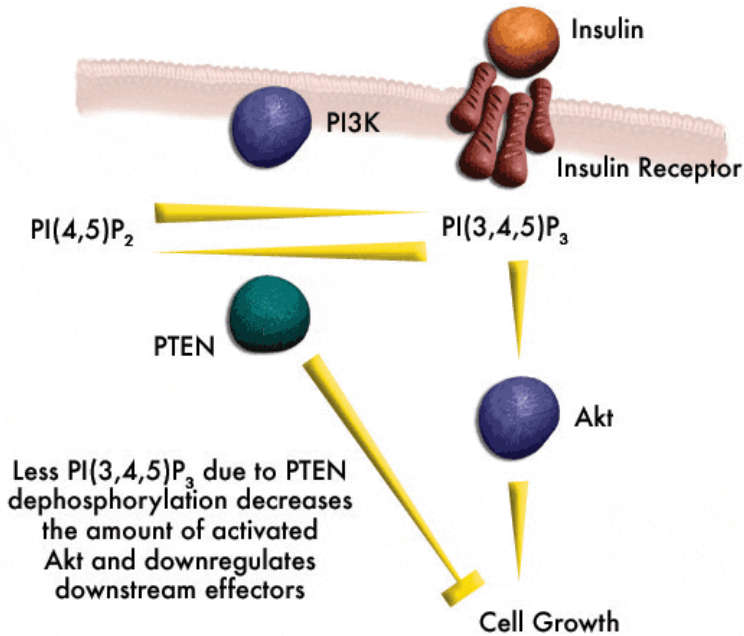


Figure 40 : Mécanisme d'action de PTEN

PTEN est un inhibiteur endogène de la voie PI3K/Akt. Il a une action opposée à celle de la PI3K en convertissant PIP3 en PIP2 empêchant ainsi l'activation d'Akt.

Éléments de Matériels et Méthodes

III. Eléments de Matériels et méthodes

A. Techniques relatives à l'hybridation différentielle sur puce à ADNc

1. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN total d'intestin embryonnaire

L'obtention d'ARN de très bonne qualité en quantité relativement importante (20µg pour une expérience), en vue de les utiliser pour une hybridation différentielle sur puce à ADN, a été difficile à partir du tissu intestinal embryonnaire et a nécessité une mise au point de la technique d'extraction. Il est en effet indispensable que ces ARN soient intègres et indemnes de toute contamination. Les caractéristiques d'échantillons de qualité sont les suivantes : $DO_{260nm}/DO_{280nm} > 1,7$; pics des ARNr 28S et 18S bien visibles sur électrophorégramme Agilent, sans signe de dégradation; ratio des quantités d'ARNr 28S/18S $> 1,7$. Plusieurs conditions de traitement des échantillons (condition de lyse, conservation, traitement à la DNase, purification) ont été testées pour aboutir au protocole suivant :

Extraction d'ARN au thiocyanate de guanidium et au phénol/chloroforme

Les intestins embryonnaires disséqués ont été immédiatement plongés dans 750µl de solution TRI-REAGENT® (Molecular Research Center), et lysés tout d'abord par refoulements à la pipette puis à l'aide d'une seringue de 1ml à fine aiguille (26G, 0,45x12mm). L'ajout d'1µl de glycogène à 20µg/µl a permis un rendement optimal de l'extraction. Après avoir laissé agir la solution de lyse 5 min à température ambiante, les débris cellulaires sont éliminés après une centrifugation de 5 min à 10000g. 150µl de chloroforme sont ajoutés au surnageant. Après homogénéisation, les échantillons sont laissés 10 min à température ambiante, puis centrifugés 15 min à 10000g et à 4°C. La phase aqueuse est alors récupérée et l'ARN est précipité par ajout de 375µl d'isopropanol à -20°C une nuit. Le lendemain, la préparation est centrifugée 30 min à 10000g à 4°C. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé dans 750µl d'éthanol 75% centrifugé à 7500g pendant 5 min puis séché 10 min à l'air ambiant, pour finalement être repris dans 100µl d'EUP autoclavée. Une deuxième purification est alors réalisée par ajout de 100µl d'un mélange de phénol pH4,5/chloroforme (5/1). Après homogénéisation, suivie d'une centrifugation de 15 min à 10000g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et l'ARN est précipité par ajout de 20µl d'acétate de sodium 3M et de 250µl d'éthanol absolu, 30 min à -80°C. Le culot est lavé dans 560µl d'éthanol 75% par une centrifugation de 5 min à 7500g puis séché à l'air comme précédemment et repris dans 30µl d'EUP autoclavée. Les échantillons d'ARN sont conservés à -20°C.

Evaluation de la concentration des échantillons d'ARN

La quantité et la pureté des ARN sont déterminées par mesure de la Densité Optique aux longueurs d'ondes 260 nm et 280 nm.

Evaluation de la qualité des échantillons d'ARN

- électrophorèse sur gel d'agarose

La qualité des ARN est tout d'abord vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du TBE 0,5X (figure 41 I). Les échantillons à déposer sont préparés comme suit: 1µg d'ARN auquel sont ajoutés 0,1µl de bromure d'éthidium à 10mg/ml et 2µl d'un bleu de dépôt contenant 3 volumes de formamide déionisée, 1 volume d'EUP autoclavée et du bleu de bromophénol. Avant leur dépôt sur gel, les échantillons sont dénaturés 10 min à 65°C.

- électrophorèse capillaire

La réalisation d'une puce à ADN nécessitant des ARN de très grande qualité, les échantillons présentant un profil de migration correcte sur gel d'agarose sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire sur puce Agilent "RNA 6000 nano LabChip". Cette technique permet de déterminer la concentration, la pureté et l'intégrité des ARN avec une haute sensibilité. Un gel,

contenant un fluorochrome qui marque l'ARN, est injecté, par pressurisation à l'aide d'une seringue, dans les capillaires de la puce. Dans les douze puits de dépôt des échantillons sont déposés 5µl de tampon, contenant un fluorochrome et un témoin de calibrage, puis 1µl d'échantillon d'ARN préalablement dilué à une concentration comprise entre 10 et 500 ng/µl. Dans le puits servant au calibrage, sont déposés 5µl du même tampon et 1 µl de marqueur de taille. Le contenu des puits est mélangé sur "vortex". La puce est alors placée dans le compartiment d'analyse de l'appareil "Agilent 2100 Bioanalyser", qui applique des courants de haut voltage, via des électrodes en platine, permettant la séparation des fragments d'ARN selon leurs tailles. La quantification des différents fragments d'ARN se fait par mesure de la fluorescence. L'analyse du profil électrophorétique permet de déterminer la concentration des échantillons en ARN et leur qualité (figure 41 II).

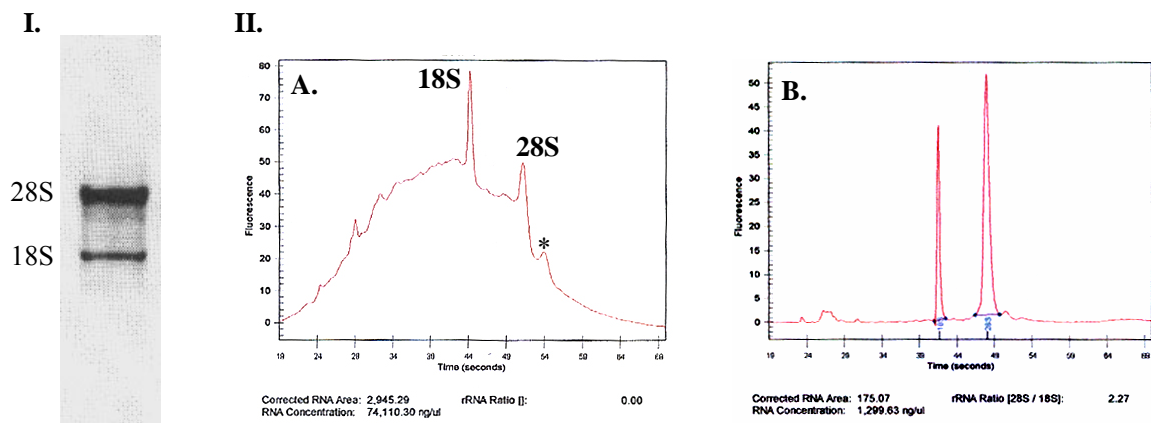


Figure 41 : Vérification de la qualité des ARN totaux avant leur utilisation pour l'hybridation différentielle sur puce à ADNc

- I. Electrophorèse sur gel d'agarose 1%:** échantillon d'ARN préalablement dénaturé.
II. Les électrophorégrammes Agilent permettent de visualiser la dégradation de l'ARN

(A) Echantillon partiellement dégradé (B) Echantillon intègre: seuls les deux pics des ARNr 28S et 18S sont visibles; ratio 28S/18S correct.

Les ARN utilisés pour les expériences de « microarray » présentaient des ratios des DO_{260nm}/DO_{280nm} compris entre 1,7 et 2,2. La migration des échantillons sur gel d'agarose montrait un profil correct avec une bande 28S plus large et plus intense que la bande 18S. L'analyse sur puce Agilent a révélé une qualité très satisfaisante des échantillons.

Pour approximativement 300 intestins embryonnaires disséqués (dont les hétérozygotes non utilisés), 41 ont servi à l'extraction d'ARN $+/+$ issus de la lignée transgénique, 39 ont servi à l'extraction d'ARN $-/-$ et 46 à l'extraction d'ARN de souris sauvages C57BL/6J. Après certains regroupements, sur les 94 échantillons d'ARN obtenus, 62 présentent des profils corrects sur puce Agilent et 24 ont été sélectionnés pour leur grande qualité.

2. Personnalisation des puces à ADNc

Les puces utilisées contiennent **10752 ADNc** correspondant à **2150 gènes murins uniques** déposés au moins en **duplicats**. Ces gènes correspondent à des EST (clones IMAGE) ou à des ADNc issus de la plateforme Transcriptome de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire - Strasbourg-Illkirch). L'avantage d'utiliser ce type de puce est de pouvoir la personnaliser par l'ajout d'ADNc d'intérêt. Après examen du contenu de la puce, il nous a paru judicieux d'ajouter 12 gènes : les gènes de laminines non présents (chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$,

$\alpha 4$, $\beta 2$), de récepteurs des laminines (intégrine $\alpha 2$, Luthéran), de marqueurs de jonctions intercellulaires (connexines 40, 43 et 45), de protéines nucléaires potentiellement modulées par les laminines (Prox1, hNRNP A2/B1) et un gène de signalisation impliqué dans le développement intestinal (sonic hedgehog). Dans ce but, les ADNc correspondants devaient être clonés. Des clones correspondant aux chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 4$ de laminine et au gène Prox1 avaient été précédemment préparés au laboratoire et j'ai réalisé le clonage des 8 autres (tableau III). Les 8 fragments d'ADNc obtenus par RT-PCR, correspondant si possible à la région 3' non traduite des ARNm (la plus spécifique), ont été clonés dans le vecteur pGEMT Easy (figure 39). Les tailles des différents fragments clonés ont été vérifiées par excision et correspondent bien aux tailles attendues, excepté pour le Luthéran qui n'a donc pas été déposé sur la puce. L'analyse de la séquence des autres fragments clonés nous a permis de déterminer leur orientation dans le vecteur et de conclure à 100% d'identité avec les séquences de l'ARNm du gène d'intérêt correspondant.

Gènes clonés	Nom du vecteur	Taille de l'insert (pb)
Connexine 40	pGEMT Easy – connexin 40	429
Connexine 43	PGEMT Easy – connexin 43	491
Connexine 45	PGEMT Easy – connexin 45	412
hNRPN A2/B1	PGEMT Easy – hNRNP A2/B1	206
Intégrine $\alpha 2$	PGEMT Easy – integrin $\alpha 2$	410
Laminine $\beta 2$	PGEMT Easy – laminin $\beta 2$	486
Lutheran	PGEMT easy - Lutheran	662
Sonic hedgehog	PGEMT Easy – Sonic hedgehog	310

Tableau II : ADNc ajoutés sur les puces

Les différentes étapes de clonage sont décrites ci-dessous :

Traitement DNase d'échantillons d'ARN

6 μ g d'ARN extraits de tissus ou de cellules riches en transcrits des gènes d'intérêt sont mis en présence d'1 unité de DNase RNase-free (Boehringer Mannheim) et de 3 μ l de tampon DNase (Tris HCl 20mM pH 6,8, MgCl₂ 10mM), dans un volume final de 30 μ l. La réaction enzymatique se fait à température ambiante pendant 15 min. La DNase est ensuite inactivée par ajout de 0,5 μ l d'EDTA 0,5M puis par chauffage à 65°C pendant 15 min.

RT-PCR

-synthèse d'ADNc par transcription inverse des ARN

3 μ g des ARN traités à la DNase sont mis en présence de 3 μ l d'hexanucléotides de séquences aléatoires à 0,3 μ g/ μ l et de 6,5 μ l d'EUP autoclavée, puis incubés 5 min à 75°C afin de permettre la dénaturation de l'ARN et l'hybridation des amorces. Sont ensuite ajoutés 3 μ l de tampon réactionnel 10X (Tris-HCl 250mM pH 8,3, MgCl₂ 50mM, KCl 500mM, DTT 20mM), 0,5 μ l d'AMV reverse transcriptase (Finnzymes) à 20U/ μ l et 2 μ l d'un mélange des 4 dNTP 10mM. La synthèse d'ADNc se déroule pendant 1 h à 42°C. L'enzyme est dénaturée à 95°C durant 5 min à la fin de l'amplification.

- « hotstart-PCR »

Deux mélanges de 50 μ l sont réalisés, contenant d'une part 2 μ l de la solution d'ADNc, 2 μ l de chaque amorce (choisie dans la région 3' non codante de l'ARNm du gène d'intérêt. Leur spécificité ainsi que celle du produit de PCR attendu ont été recherchées par BLAST), 0,2 μ l de chaque dNTP à 100mM(v), 5 μ l de tampon réactionnel (Tris-HCl 10mM pH8,8, KCl 50mM, Triton X-100 0,1%, MgCl₂ 1,5mM) et d'autre part 5 μ l du même tampon réactionnel et 0,5 μ l de DNA polymérase (DyNAzyme, Finnzymes) à 2U/ μ l. Les deux mélanges sont séparés par de la paraffine (Finnzymes) qui fond à 50°C et qui évite les réactions aspécifiques de l'enzyme. La PCR est réalisée dans les conditions suivantes: 3 min à 94°C, puis 40 cycles de [30 sec à 94°C, 30

sec à la température optimale d'hybridation du couple de primers utilisé, 1 min à 72°C], et enfin 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant 1ng/ml de bromure d'éthidium dans du tampon TBE 0,5X.

Purification des produits de PCR – Utilisation du “QIAquick PCR Purification kit”(Quiagen)

Le procédé est basé sur la rétention sélective d'ADN sur une membrane en gel de silice en présence d'une molarité élevée en sel et d'un pH inférieur à 7,5. Après lavage, l'ADN adsorbé est élué de la colonne dans 50µl de tampon contenant 10mM de Tris-HCl pH 8,5, précipité par 100µl d'éthanol absolu et 1,5µl de NaCl 5M. Le culot d'ADN est récupéré par 15 min de centrifugation à 10000g puis lavé deux fois dans 200µl d'éthanol 70% pour finalement être resuspendu dans 10µl d'EUP. Les produits purifiés sont analysés comme précédemment et conservés à -20°C.

Clonage des produits de PCR dans un vecteur T

Le clonage est réalisé dans le vecteur “pGEM-T Easy” (Promega). Ce vecteur, linéarisé, possède à ses extrémités 3' des résidus thymidines qui sont complémentaires aux résidus adénosines ajoutés aux produits de PCR par l'activité « Terminal deoxynucleotidyl Transférase » de la DNA polymérase au cours de la PCR. La réaction de ligation est réalisée en présence de 150ng de produit de PCR, de 50ng de vecteur, et de 10µl de tampon réactionnel (ATP 2mM, 10% PEG, Tris-HCl 60mM pH 7,8, MgCl₂ 20mM, DTT 20mM, Promega), par 3U de T4 DNA ligase (Promega) dans un volume final de 20µl. La ligation se déroule pendant 2 h à température ambiante.

Transformation de bactéries compétentes

100µl de bactéries XL1-Blue compétentes sont mis en présence de 20µl de produit de ligation, de 20µl de KCM (KCl 0,5M, CaCl₂ 0,15mM, MgCl₂ 0,25M) et de 60µl d'EUP, placées 20 min sur glace puis 10 min à température ambiante afin de créer un choc thermique. 800µl de milieu LB sont ajoutés aux bactéries. Le tout est alors mis à incuber à 37°C sous agitation pendant 40 min avant d'être étalé sur boîte de milieu LB (Luria Bertani: tryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 10g/l) contenant de l'agar (15g/l) et de l'ampicilline (50µg/µl), qui permet la sélection des bactéries transformées, et en présence de 10µl d'IPTG 100mM et de 50µl de X-Gal 2%. Ces boîtes sont incubées une nuit à 37°C. La sélection des bactéries transformées avec le vecteur contenant l'ADNc d'intérêt se fait grâce à la présence du gène LacZ dans la cassette de clonage du plasmide pGEM-T-easy, qui permet l'hydrolyse du X-Gal conférant une coloration bleue aux bactéries transformées avec le vecteur sans insert. Les bactéries possédant un vecteur avec insert voient le cadre de lecture du gène LacZ décalé et restent blanches.

Minipréparation d'ADN plasmidique

Une colonie bactérienne blanche isolée, contenant l'insert d'intérêt est inoculée dans 1,5 ml de milieu LB contenant 1,5µl d'ampicilline (50µg/µl) pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 1ml de cette culture est centrifugé 1 min à 10000g. Au culot sont ajoutés 300µl de tampon TENS (10mM Tris, 1mM EDTA, 0,1N NaOH, 0,5% SDS) afin de lyser les bactéries. Après homogénéisation, 150µl d'acétate de sodium 3M pH 5,5 sont ajoutés au lysat dans le but de précipiter les protéines et l'ADN chromosomique. Après 2 min de centrifugation à 10000g et reprise du surnageant, l'ADN plasmidique est précipité par 1ml d'éthanol absolu à -20°C. Une centrifugation de 2 min à 10000g permet de récupérer le culot qui sera lavé avec 1ml d'éthanol 70% à -20°C. L'ADN plasmidique est alors séché 15 min à l'air libre puis repris dans 50µl de tampon RB (RNase Buffer: 10mM Tris, 1mM EDTA, 0,01% gélatine, 40µg/ml RNase) à 65°C pendant 20 min. Afin de vérifier que les plasmides contiennent bien l'ADNc d'intérêt, les inserts sont excisés, dans un volume réactionnel de 12µl, en présence de 10µl d'ADN plasmidique, 0,2µl d'enzyme de restriction EcoRI à 100000U/ml (Biolabs), 1,2µl de tampon d'enzyme (Biolabs) et 0,6µl d'EUP. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 3% contenant 1ng/ml de BET, dans du TBE 0,5X.

Midipréparation d'ADN plasmidique - Utilisation du kit "QIAGEN Plasmid Purification" -

Cette technique permet l'obtention de quantité importante d'ADN plasmidique, à savoir entre 150 et 300µg. 1µl de culture de départ des « minipreps » sélectionnées pour posséder un insert de taille correcte est inoculé dans 50ml de milieu LB contenant 50µl d'ampicilline (50µg/µl). La culture est amplifiée une nuit sous agitation à 37°C. Après centrifugation de 15 min à 6000g, le culot bactérien est resuspendu dans 4ml de tampon contenant 50mM de Tris-HCl pH 8, 10mM d'EDTA, 100µg/ml de RNase A. Une lyse alcaline des bactéries est réalisée au moyen de NaOH 200mM et de SDS 1%. Les protéines sont précipitées par de l'acétate de potassium 3M pH 5,5. Le lysat est ensuite déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anion (DEAE-résine QIAGEN). Après 2 lavages, les plasmides sont élués par une solution d'éluion [NaCl 1,25M, Tris-HCl 50mM pH 8,5, isopropanol 15% (v/v)], puis précipités avec 3,5ml d'isopropanol. Le culot d'ADN lavé à l'éthanol 70% et séché est resuspendu dans 50µl d'une solution de Tris 10mM, EDTA 1mM et conservé à 4°C. La présence des inserts d'intérêt est vérifiée comme précédemment par digestion enzymatique et migration des produits sur gel d'agarose. La composition nucléique et l'orientation des inserts sont déterminées par séquençage.

3. Constitution des puces à ADNc

Les puces à ADNc utilisées porte l'identifiant MM11 et consiste en une lame de verre sur laquelle 10752 ADNc, correspondant à 2150 gènes murins uniques, sont déposés à l'aide d'un micropipetteur robotisé. Cette puce a été réalisée en collaboration avec la plateforme Transcriptome de l'IGBMC (équipe du Dr. P. Kastner).

Obtention des produits de PCR à déposer

Des fragments d'ADNc de 300 à 1000 pb correspondant aux gènes d'intérêt, issus d'une banque préalablement constituée à l'IGBMC ou clonés au laboratoire, sont obtenus en quantité suffisante par amplification spécifique par PCR. Les conditions de réaction sont identiques à celles utilisées précédemment, mais à l'aide des amorces universelles sens et antisens (PU et RP).

Purification des produits de PCR

La purification est réalisée à l'aide d'un robot sur plaque « multiscreen » (Millipore) contenant des filtres en fibre de verre. 80µl d'une solution de guanidium 7M et 80µl de produits de PCR sont déposés par puits. Un système d'aspiration sous-jacent permet la fixation des ADNc avec le guanidium sur les fibres de verre. 7 lavages avec 180µl d'éthanol 80% sont réalisés. 2 éluions des produits de PCR sont ensuite effectuées dans 45µl d'EUP autoclavée par centrifugation de 15 min à 1000g.

Quantification des produits de PCR purifiés

Le même robot réalise un mélange de 3µl des produits de PCR purifiés et de 10µl d'un tampon de charge contenant de l'EDTA 5mM, 24% de formamide et 1/500^e de solution commerciale de fluorochrome picogreen (Molecular Probes). Il est alors programmé pour déposer 10µl de ce mélange sur un gel d'agarose 1,7%, parallèlement à un marqueur de taille. La migration des échantillons se déroule sous 140V dans du TAE (Tris 40mM, acide acétique, EDTA 2mM). Le gel est ensuite « scanné » après exposition à la longueur d'onde d'excitation du picogreen (502nm). L'intensité de fluorescence émise à 523nm a été mesurée à l'aide du logiciel Total lab et est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans les bandes de migration.

Dépôt et fixation des produits de PCR sur lame de verre

Les lames sont recouvertes par une couche de Gamma Amino Propyl Silane (Corning Microarray Technology) qui va permettre l'adsorption de l'ADN sur la surface de la lame. Le dépôt est effectué à l'aide d'un micropipetteur robotisé; chaque gène est ainsi représenté sous forme de point sur la lame. Les ADN sont ensuite fixés de manière covalente sur la lame de verre par exposition aux rayons UV.

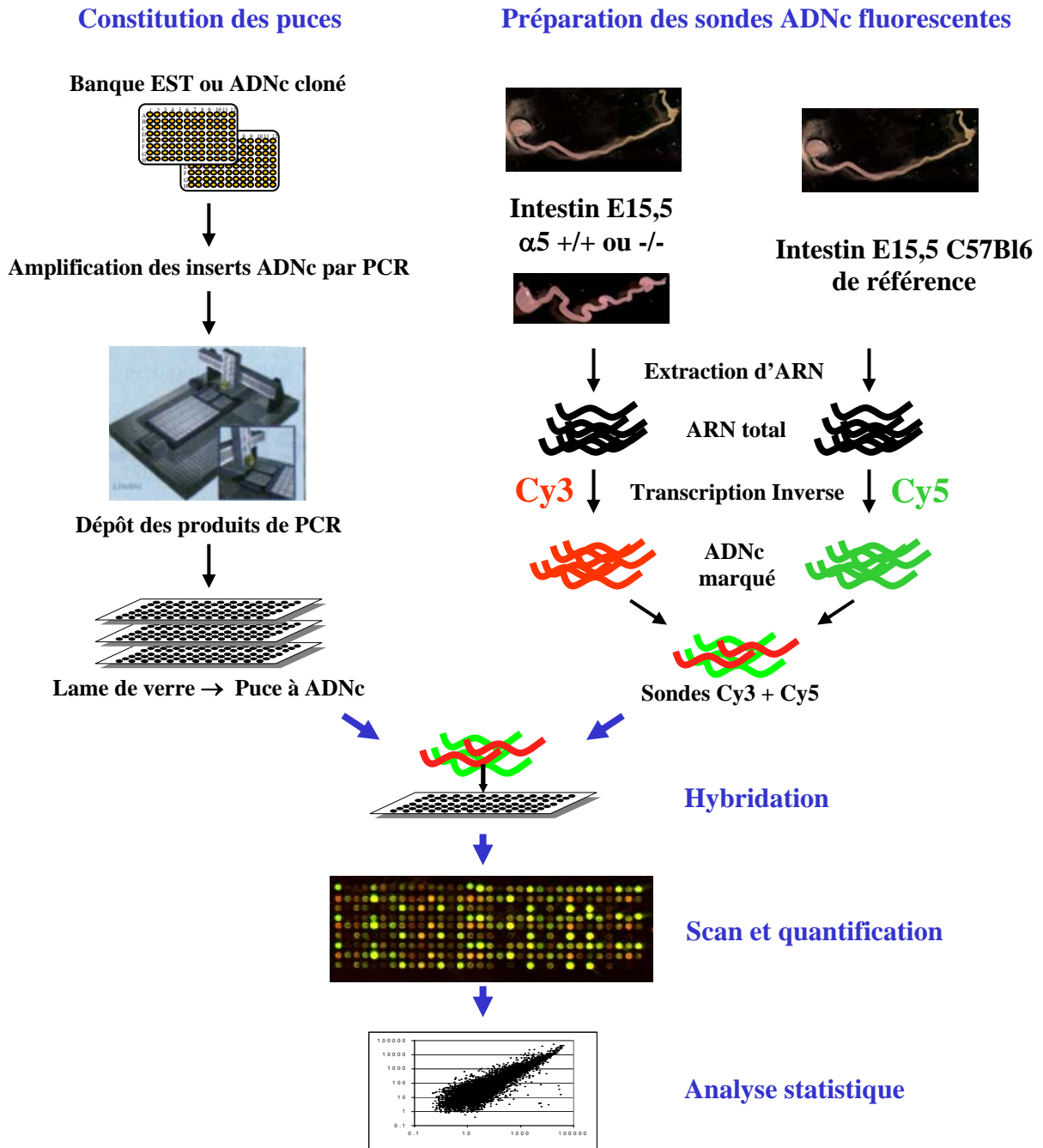


Figure 42 : Expérience de « microarray »

Deux échantillons d'ARN (sous forme d'ADNc obtenus par transcription inverse) marqués par des fluorophores différents (Cy3 rouge et Cy5 vert) sont hybridés simultanément avec les ADNc complémentaires sur la puce. L'intensité du signal lumineux est mesurée aux longueurs d'onde correspondant aux deux fluorophores à l'aide d'un microscope confocal. Le rapport Cy3/Cy5 est ainsi déterminé et permet de comparer les taux d'expression relatifs de chacun des gènes pour les deux échantillons.

4. Expérience de « microarray » ou hybridation différentielle sur puce à ADNc

Par cette expérience, j'ai comparé les profils d'expression génique des ADNc issus des intestins de souris sauvages et homozygotes mutantes pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine. L'analyse a été réalisée en **4 réplicats biologiques** provenant de **4 portées différentes**. 4 échantillons +/+ et 4 échantillons -/- pour la chaîne $\alpha 5$ provenant respectivement de la même portée ont été comparés. Chacun de ces échantillons a été hybridé simultanément avec une référence commune constituée d'ARN issus d'intestins de souris sauvages C57Bl/6J, de même fond génétique que la lignée transgénique (figure 42). Les expériences d'hybridation ont été réalisées en « **flip/flop** », c'est à dire en marquant les échantillons au Cy3 et la référence au Cy5 puis inversement afin d'éliminer le biais issu de la différence d'incorporation des 2 fluorochromes. Les quantités relatives des ARNm, représentées par la moyenne des ratios des échantillons contre la référence des expériences flip et flop, ont été déterminées dans les 8 échantillons pour chacun des 10752 ADNc qui composent la puce.

Synthèse des sondes

Les sondes ADNc sont synthétisées à partir des échantillons d'ARN totaux par transcription inverse. L'utilisation d'oligodT favorise la synthèse d'ADNc à partir des ARNm. Ces sondes sont rendues fluorescentes par incorporation de dUTP couplés à la cyanine 3 (Cy3) ou à la cyanine 5 (Cy5). 10 μ g d'ARN totaux sont mis en présence de 2 μ l d'oligodT à 1 μ g/ μ l. Une incubation de 5 min à 70°C permet la dénaturation des ARN et l'hybridation des oligodT. Sont ensuite ajoutés 15 μ l de milieu réactionnel (dATP 1mM, dCTP 1mM, dGTP 1mM, dTTP 0,2mM, DTT 1mM et tampon d'enzyme), 3 μ l de dUTP-Cy3 ou dUTP-Cy5 1mM et 2 μ l de Superscript II Reverse Transcriptase (400U) (Invitrogen). La synthèse de l'ADNc se déroule pendant 2h à 42°C. L'enzyme est alors inactivée par chauffage de 5 min à 70°C. Les ARN restants sont dégradés par ajout de 5 μ g de RNase A (Sigma) et incubation de 45 min à 37°C. Après ajout d'un tampon de charge contenant de l'OliGreen, la qualité des sondes est vérifiée sur gel d'agarose 1% par détection de la fluorescence de l'OliGreen, du Cy3 et du Cy5. Les sondes sont ensuite purifiées et concentrées sur filtre Microcon YM-30 (Amicon) selon le protocole du fabricant. 10 μ g d'ADN Cot 1 de souris (suppresseur de séquences hautement répétées dans le génome murin, Life Technologies) et 10 μ g d'ADN génomique de sperme de saumon sont ajoutés à l'ADNc au cours de la purification et empêcheront les hybridations non spécifiques.

Hybridation

Afin d'éviter une fixation aspécifique des sondes, les puces à ADNc précédemment constituées sont plongées dans un tampon de pré-hybridation (50% formamide déionisée, 5X SSC, 0,1% SDS, 0,1% BSA) pendant 1h à 42°C, puis lavées avec de l'eau milliQ et séchées par centrifugation. En parallèle, les sondes sont incubées 2 min à 95°C et 45 min à 46°C afin de les dénaturer et d'y appairer le Cot 1. 37 μ l de tampon d'hybridation [formamide pure déionisée 50%, SSC 4X (NaCl 0,6M, citrate de sodium 0,06M), SDS 0,6%, Denhardt 5X (Ficoll 0,1%, polyvinylpyrrolidone 0,1%, BSA 0,1%), polyA 80 0,1 μ g/ μ l] sont ajoutés aux 3 μ l de sonde purifiée. La sonde est alors placée au contact de la puce, entre lame et lamelle. La lame est placée dans un chambre d'hybridation humide et incubée 14 h à 46°C. Un lavage de stringence croissante (bain de 2X SSC/0,2% SDS à 65°C, de 2X SSC à température ambiante, puis de 0,2X SSC à température ambiante) est réalisé pour décrocher les fixations aspécifiques.

Acquisition et analyse des données

La lecture des lames est réalisée à l'aide du scanner ScanArray 4000 (Packard Biochip) qui se compose d'un microscope confocal couplé à un photomultiplicateur et qui contient des lasers qui permettent l'excitation des cyanines Cy3 et Cy5. La lame est ensuite réhybridée avec une sonde universelle détectant l'ADN, quel qu'il soit, ce qui permet de repérer d'éventuelles erreurs robotiques lors du dépôt des produits de PCR.

Les images obtenues sont quantifiées à l'aide du logiciel Imagene 5.0 (Biodiscovery), après création d'une grille de quantification, superposable aux spots de la puce. Le logiciel permet pour

chaque spot de mesurer la moyenne et la médiane des intensités et le bruit de fond local. Pour l'interprétation des données, j'ai choisi de travailler sur la médiane des intensités des pixels composant un spot, car cette valeur exclut les pixels dus à des poussières lumineuses et les pixels noirs dus au dépôt non homogène des spots. Les données sont ensuite normalisées par l'algorithme « Lowess », méthode de normalisation locale (figure 43). Le taux d'expression des gènes est normalisé grâce à une courbe construite à partir de gènes invariants, déterminés par la « méthode des rangs invariants ». Certaines données de quantification correspondant notamment à des gènes faiblement exprimés montrant donc des ratios faussés sont ensuite filtrées avant la réalisation d'un « clustering » à l'aide des logiciels Cluster 3.0 et Java TreeView (Eisen, Stanford University).

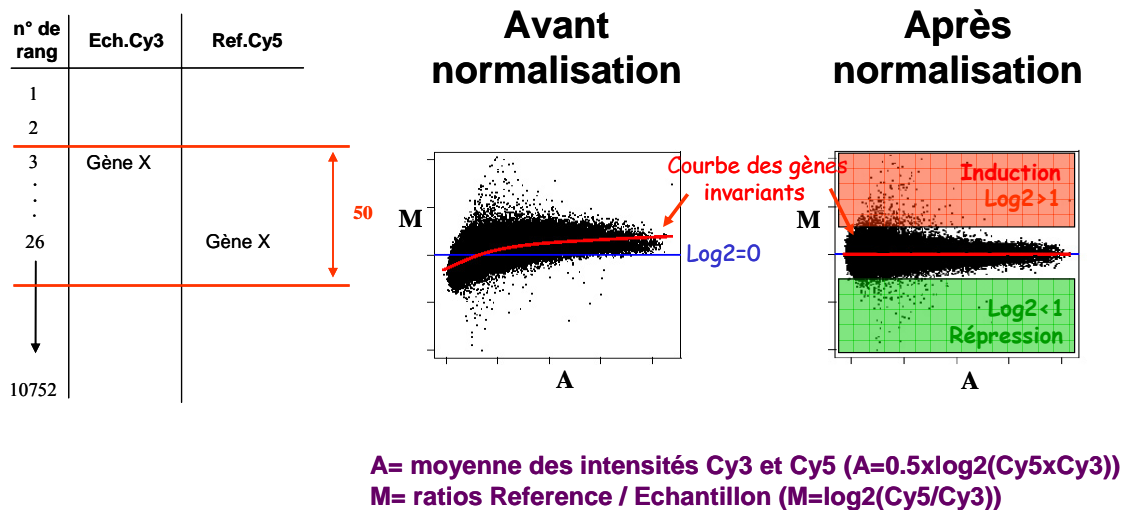


Figure 43 : Méthode de normalisation des rangs invariants

La normalisation des données de quantification a été réalisée grâce à une méthode de normalisation dite des rangs invariants. Les spots d'intensité nulle sont ôtés de l'analyse, ainsi que les spots à saturation. Les valeurs des intensités des spots correspondant à l'échantillon qui a, par exemple, été marqué au Cy3 et celles correspondant à la référence, donc marquée au Cy5, sont classées par ordre croissant d'intensité. Un seuil de différence de rang est déterminé, dans mon cas 50. Un gène sera considéré invariant si la différence de rang d'intensité entre l'échantillon et la référence est inférieure à 50. Une représentation graphique des intensités est réalisée. Les moyennes des intensités Cy3 et Cy5 sont placées en abscisse et le ratio des intensités Cy3/Cy5 en ordonnée. C'est le \log_2 des valeurs qui est utilisé pour aboutir à une symétrie dans les échelles. La courbe rouge correspond aux gènes invariants déterminés précédemment. L'équation de cette droite est calculée et pour chaque point, un facteur de variation locale par rapport à la droite $\text{Log}_2=0$ est calculé. Ce facteur est soustrait à chaque point de la courbe de façon à l'aligner à la droite correspondant à une égalité parfaite des intensités pour les gènes considérés invariant. Cette même normalisation, donc locale, est réalisée pour tous les gènes. Les ratios compris entre -1 et 1 correspondent à des gènes considérés non différentiellement exprimés, Les ratios > 1 aux gènes sur-exprimés de plus de 2 fois et les ratios < 1 aux gènes sous-exprimés de plus de 2 fois dans l'échantillon marqué au Cy3 / à la référence.

B. Modèles de culture cellulaire et applications

1. Mise en place de modèles cellulaires

Afin de savoir dans quel compartiment tissulaire, embryonnaire ou adulte, a lieu la régulation génique par la chaîne $\alpha 5$, j'ai travaillé avec 4 types de cultures cellulaires de souris, pour lesquelles je souhaitais obtenir des cellules $\alpha 5^{+/+}$ et $\alpha 5^{-/-}$ afin de pouvoir étudier les différences signalétiques. Les protocoles détaillés pour l'obtention de ces modèles cellulaires sont décrits dans la publication 1 mais je tiens ici à poser les bases stratégiques de nos analyses *in vitro*.

a) Modèles embryonnaires :

- **cultures primaires d'endoderme intestinal,**
- **cultures primaires de mésenchyme intestinal.**

Ces 2 modèles sont obtenus après dissection puis traitement à la collagénase d'intestins embryonnaires Lama5^{+/+} ou Lama5^{-/-} de 15,5 jours de vie fœtale, suivi d'une dissociation mécanique de l'endoderme et du mésenchyme. Malheureusement les cellules endodermiques ne survivent que quelques heures en culture et les cellules mésenchymateuses ne supportent que 2 ou 3 repiquages.

b) Modèles de cellules matures :

- **lignée de cellules intestinales épithéliales m-IC₁₂,** qui ont été immortalisées ont été établies à partir de la mise en culture d'épithélium de la base des villosités de l'intestin grêle moyen de souris transgénique pour l'antigène grand T de SV40, au stade E20 (Benz et al., 1996). Nous avons choisi ces cellules d'une part pour rester dans l'espèce murine et d'autre part car c'est l'une des rares lignées de cellules intestinales non tumorales. Ces cellules présentent plutôt des caractéristiques de cellules de crypte et expriment la chaîne $\alpha 5$ de laminine (figure 45).
- **cultures primaires de cellules musculaires lisses intestinales adultes,** obtenues par dissection du muscle intestinal de souris sauvage puis dissociation des cellules par traitement avec une solution de trypsine/collagénase. La pureté et le maintien de la différenciation de ces cellules lors de la culture ont été vérifiés par immunorévélation de marqueurs spécifiques du muscle lisse (figure 44)

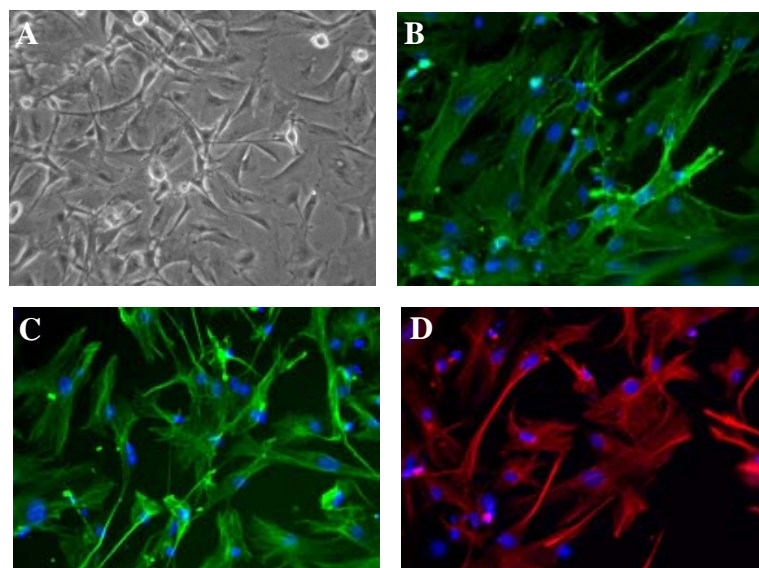


Figure 44: Validation des cultures primaires de cellules musculaires lisses intestinales
Aspect en contraste de phase (A); Immunomarquage de l' α -actine (B, marquage vert), de la desmine (C, marquage vert) et de la vimentine (D, marquage rouge). Le marquage bleu correspond au DAPI et révèle les noyaux.

Afin d'obtenir des cellules intestinales matures **invalidées pour la chaîne $\alpha 5$** , j'ai tenté d'inhiber l'expression de la chaîne $\alpha 5$ par des shRNA.

Essais d'inhibition de la chaîne $\alpha 5$ par RNAi

5 shRNA comportant 2 séquences complémentaires de 21 nucléotides, choisies après les 100 nucléotides suivant le codon initiateur et avant les 100 nucléotides précédant le codon stop de l'ADNc de la chaîne $\alpha 5$, et séparées par une boucle de 9 nucléotides ont été générés, de même que les séquences antisens correspondantes. Les shRNA sens et antisens ont tout d'abord été hybridés dans du tampon d'annealing Promega 10X pendant 5 minutes à 80°C puis par un abaissement progressif de la température à 25°C à raison d'1° par minute. Une ligation des shRNA doubles brins a ensuite été réalisée dans le vecteur psiRNA3-hH1GFPzeoG2. La transformation de bactéries SCHUR avec les produits de ligation a été réalisée comme décrit précédemment mais avec sélection des clones par la zéocine (25µg/µl). Les clones ont été amplifiés par midiprep et leur intégrité a été vérifiée par séquençage. Les cellules m-IC₁₂ ont été transfectées avec les shRNA par le jet PEI (Polyplus transfection) entre une demi-heure et deux heures après ensemencement afin qu'elles n'aient pas le temps de sécréter des éléments matriciels. L'ADN plasmidique est mis en solution dans du NaCl 150 mM ; le jet PEI (3µl pour 1µg d'ADN) est également mis dans une solution de NaCl 150 mM. La solution contenant le jetPEI est ajoutée à la solution d'ADN plasmidique. Le mélange est vortexé et centrifugé. Au bout de 30 min de repos à température ambiante, le mélange est ajouté dans du milieu de culture, puis dans les puits cellulaires. L'efficacité de la transfection est vérifiée par fluorescence de la GFP portée par le vecteur.

Les ARN ou les protéines des cellules ont été extraits à 24h, 48h, 72h et 144h après transfection. L'efficacité des shRNA a été analysée par RT-PCR ou par Western Blot (figure 45). Aucune diminution de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ n'a été trouvée. Les shRNA testés soit individuellement, soit sous forme de mélange, n'ont montré aucune efficacité pour l'extinction de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les cellules m-IC₁₂.

Pour les cellules musculaires lisses intestinales, je n'ai pas réussi à obtenir une transfection efficace, ni avec le jet PEI, ni avec de la lipofectamine.

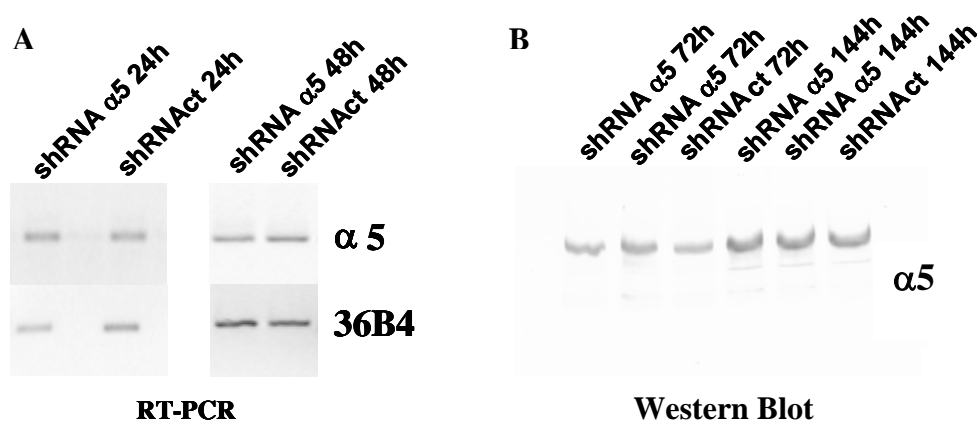


Figure 45: Test de l'efficacité des shRNA après différents temps de transfection dans les cellules m-IC₁₂

L'expression de la chaîne $\alpha 5$ a été révélée par RT-PCR (A) ou Western Blot (B). shRNA $\alpha 5$ correspond à un mélange des 5 shRNA anti- $\alpha 5$. Le shRNA act correspond à un shRNA anti-luciférase.

Ensemencement des cellules sur une matrice de laminine-511

Les tentatives d'inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ ne s'étant pas révélées efficaces dans les cellules en culture, nous avons décidé d'adopter la stratégie inverse qui consiste à **cultiver les cellules sur de la laminine-511**, contenant la chaîne $\alpha 5$, et de comparer les effets par rapport à des cellules ensemencées sur plastique ou sur laminine-111. La laminine-511 utilisée correspond en fait à une matrice riche en laminine-511 obtenue par ensemencement de cellules CaCo2-TC7 sur plaque 24 puits pendant 10 jours puis décollément des cellules par une solution de Triton 1%, EDTA 10 mM, TrisHCl 25 mM, pH 7,5 ; la matrice qu'elles ont sécrétée reste adhérente au fond des puits (Turck N et al., 2005). La laminine-511 est la seule laminine intègre sécrétée par ces cellules (figure 46). En effet, les cellules CaCo2-TC7 n'expriment pas les chaînes $\alpha 2$, $\alpha 4$ (résultats personnels de RT-PCR) et $\alpha 3$ (Orian-Rousseau et al., 1998) et expriment un ARNm tronqué de la chaîne $\alpha 1$ mais qui n'est pas traduit en protéine (Velling et al., 1999 et résultat personnel).

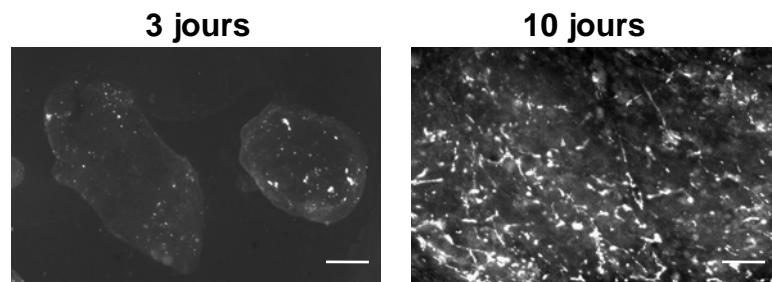


Figure 46 : Immunomarkage du dépôt de chaîne $\alpha 5$ de laminine par les cellules Caco2/TC7 après 3 et 10 jours de culture
Barres = 50 μ m

Un schéma récapitulatif des modèles cellulaires et des applications est présenté ci-dessous (figure 47) :

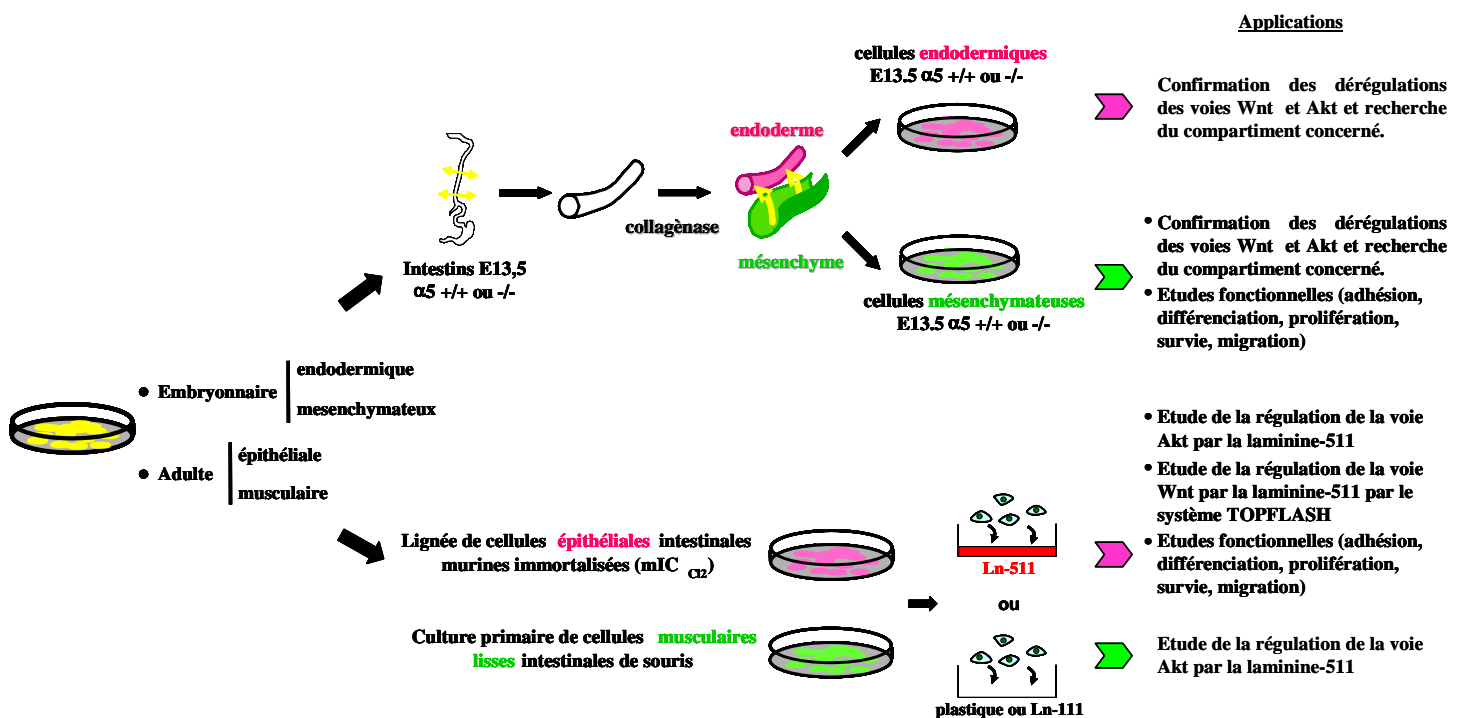


Figure 47 : Obtention de modèles *in vitro* $\alpha 5$ $+/+$ et $-/-$ embryonnaires et adultes

2. Applications

Les protocoles relatifs aux différentes applications présentées dans la figure 47 sont décrits dans la publication 1, excepté celui relatif à l'étude *in vitro* de la régulation de la voie Wnt par la laminine-511, utilisant le système TOPFLASH, que je vous détaille donc ci-après :

Le système TOPFLASH

a) Description du système TOPFLASH

Ce système permet de mesurer l'état d'activation de la voie Wnt (voie canonique) après transfection cellulaire. Ce système est basé sur le plasmide TOP codant pour les éléments de réponse Tcf/Lef (séquences d'ADN sur lesquelles se lie la β -caténine avec les facteurs Tcf/Lef pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt, voir figure 37). Ces éléments de réponse sont placés en amont d'un promoteur minimal cFos qui gouverne l'expression du gène de la luciférase firefly. C'est l'activité de la luciférase firefly, quantifiable par un luminomètre, qui reflète l'état d'activation de la voie Wnt.

D'autres plasmides sont nécessaires pour la validation du système et la quantification de l'activation :

- un témoin positif d'activation de la voie Wnt : cotransfection d'un plasmide codant pour Tcf4 et d'un plasmide codant pour une β -caténine mutée (qui ne peut être dégradée et qui s'accumulera dans le noyau activant la voie Wnt)
- un témoin négatif d'activation de la voie Wnt : transfection du plasmide FOP (plasmide TOP muté au niveau des sites de réponse Tcf/Lef, de sorte que ceux-ci ne puissent pas s'y fixer)
- la transfection d'un plasmide codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur basique (pGl3b) sert de témoin d'activité basale de la luciférase
- la transfection d'un plasmide codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur fort SV40 sert de contrôle de détection de la luminescence

3 plasmides sont ajoutés dans tous les puits de transfection :

- le plasmide codant pour la GFP (témoin positif de transfection)
- le plasmide Blue Script qui permet d'équilibrer la quantité d'ADN plasmidique entre les puits
- la transfection du plasmide « pnull renilla » codant pour la renilla luciférase sous le contrôle d'un promoteur nul sert de rapporteur interne. L'activité de cette luciférase est également quantifiée par luminométrie et est distincte de celle de la luciférase firefly.

Tous les plasmides nous ont été fournis par le Dr Hans Clevers (Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, Pays Bas) excepté les plasmides GFP et Blue Script disponibles au laboratoire.

b) Transfection cellulaire et lecture de la luminescence – Utilisation du Kit Promega « Dual luciférase reporter assay »

Les cellules d'intérêt, mICCI2 ou HEK293, sont d'abordensemencées dans des plaques 6 puits à raison de $9 \cdot 10^5$ cellules par puits puis transfectées avec les plasmides par le jet PEI comme décrit précédemment. Les cellules transfectées sont ensuite détachées par la trypsine et réensemencées dans des plaques 24 puits soit sur plastique soit une matrice enrichie en laminine-511. Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont rincées une fois au PBS. 100 μ l d'un liquide de lyse sont ajoutés dans chaque puits ; la lyse se fait sous agitation pendant 15 min. 10 μ l du lysat est ensuite placé dans une plaque de lecture. Cette plaque est ensuite insérée dans le luminomètre Lumistar BMG. 100 μ l d'un substrat (luciférase assay reagent II) de la luciférase firefly est injecté automatiquement par l'appareil dans chaque puits et la luminescence est mesurée après chaque injection. Dans un deuxième temps, 100 μ l d'un substrat bloquant la luciférase de firefly et activant la luciférase de Renilla Reniformis (Stop and Glo) sont injectés et la luminescence de la renilla est alors mesurée.

C. Technique d'immunoprécipitation de chaînes de laminine

Cette technique permet l'isolement d'une protéine donnée grâce à un anticorps spécifique et la détection d'éventuels partenaires co-précipités. Après 1h de culture sans méthionine et cystéine, des cellules musculaires lisses intestinales à 80% de confluence sont radiomarquées pendant 24h avec 150 μ Ci de Trans³⁵S-label (ICN Biomedicals) dans du milieu MEM (Sigma) additionné de sodium pyruvate 110mg/l, de glutamine 4,1mM, et de sérum de veau foetal 5%. Le milieu de culture est alors récupéré et additionné d'inhibiteurs de protéases (PMSF 1mM, NEM 1mM). Les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS sans Ca²⁺ avec inhibiteurs de protéases (PMSF 0,5mM, aprotinine 5 μ g/ml), solubilisées dans du tampon Ripa [10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM cystéine, 2mM méthionine, 250 μ M PMSF, 1mM NEM, 0,05% Triton X-100, 0,3% desoxycholate de sodium, 0,1% BSA, 0,1% SDS, 0,5% Igepal (Sigma)] et broyées. Le lysat est mis à incuber 30 min à 4°C sous agitation. Après centrifugation de 10 min à 1000g, les milieux de culture et les extraits cellulaires sont pré-incubés 1h à 4°C avec de la protéine G couplée à des billes de Sépharose 4B (Sigma), puis centrifugés 3 min à 1000g pour ôter les fixations aspécifiques. Les surnageants sont alors incubés 1h à 4°C avec un anticorps spécifique de la protéine à précipiter, puis mis en présence de nouvelles billes de Sépharose et incubés 1 nuit à 4°C. Les complexes immuns sont récupérés par centrifugation de 3 min à 10000g, lavés 5 fois dans du tampon Ripa et resuspendus dans 20 μ l d'une solution SDS-DTE (Tris HCl 62,5mM pH6,8, SDS 10%, DTE 0,1M). Les billes sont séparées par homogénéisation et centrifugation de 3 min à 10000g. Les complexes immuns sont dénaturés par incubation de 5 min à 100°C et déposés sur gel SDS-PAGE (gradient 5-10%). Le gel est calibré avec des protéines standards marquées au ¹⁴C (Amersham Pharmacia Biotech). Après incubation dans un tampon de fixation (10% acide acétique, 20% méthanol, H₂O) 30 min à 60°C et séchage, le gel est exposé à un film ultra sensible (Kodak Biomax MS) avec un écran amplificateur (Kodak BioMax transcreen Low Energy) à -80°C.

Publication 1 :

Identification of laminin $\alpha 5$ gene signature in developing intestine

Identification of laminin $\alpha 5$ gene signature in developing intestine

Léa Ritié *, Caroline Spenlé *, Joël Lacroute *, Olivier Lefebvre *, Christine Bole-Feysot [#], Bernard Jost [#], Michèle Kedinger *, Gertraud Orend *, Anne-Laure Bolcato-Bellemin [‡], Patricia Simon-Assmann *

* Inserm, U682, Strasbourg, F-67200 France; Univ Louis Pasteur, F-67000 France; [#] Microarrays Facility, Mouse Clinical Institute, Illkirch - Graffenstaden, France; [‡] Polyplus - transfection, Illkirch - Graffenstaden, France

Running head: gene expression signature of laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestine

Corresponding author and reprint requests:

Patricia SIMON-ASSMANN

Inserm U682

Development and Physiopathology of the Intestine and Pancreas

3, Avenue Molière

67200 Strasbourg- France

E-mail: Patricia.Simon-Assmann@inserm.u-strasbg.fr

Phone: (33) 3 88 27 77 27 - Fax: (33) 3 88 26 35 38

Abstract

Laminin-511, a major component of the basement membrane, plays an essential role during embryonic development and tissue homeostasis, and is required for smooth muscle development and epithelial cytodifferentiation (Bellemin-Bolcato et al. 2003). To identify the differentiation and signaling genes downstream of the laminin α 5 chain, we determined gene expression by mRNA profiling using intestinal tissue from embryonic laminin α 5 knock-out and wild-type mice. Here, we show that laminin α 5 chain affects the intestinal gene expression signature. First, the lack of α 5 results in the down-regulation of genes that are involved in differentiation of muscle and epithelium. Second, we provide evidence that laminin α 5 regulates the Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt signaling pathways, by modulating target genes of these pathways. By using, isolated embryonic endoderms and mesenchymes, and cultures of primary cells and established cells lines on laminin-511 coated surfaces, we confirmed that laminin α 5 modulates Wnt and PIK- kinase signaling and cell behavior; laminin α 5 activated spreading of intestinal epithelial and muscle cells, increased proliferation, migration and survival of epithelial cells.

Introduction

Mammalian intestinal development is a complex morphogenetic process that implies sequential interactions between tissular components. Inductive interactions between gut endoderm and the underlying mesenchyme pattern the developing digestive tract into regions with specific morphology and functions (Yasugi and Mizuno, 1996; Kedinger et al. 1998). The precise molecular mechanisms behind these interactions are largely unknown although specification into precise digestive regions has been shown to be governed by defined transcription factors such as Hox genes, Cdx1, Cdx2, Pdx1 and Barx1 (Freund et al. 1998; Beck et al. 2000; Kim and MacDonald. 2002; Kim et al. 2005). Homeostasis between cellular proliferation and differentiation in the intestine depends also on a large array of signaling molecules (for reviews see de Santa Barbara et al. 2003; Sancho et al. 2004). One such example includes the Wnt family of secreted growth factors playing a critical role in both normal development and tumorigenesis (Gregorieff and Clevers, 2005).

Extracellular matrix molecules and in particular basement membrane components have been shown to play important roles in the regulatory events implied in the sequential and reciprocal epithelial/mesenchymal interactions. The basement membrane contains a combination of permissive and inhibitory cues whose expression is regulated in space and time. In the intestine, the laminin family of glycoproteins represents a major component of the basement membranes found in the interface between endoderm and mesenchyme and between adult epithelial cells and the underlying connective tissue (Simon-Assmann et al. 1998 and 2003; Teller and Beaulieu, 2001). Laminins have been implicated in a broad array of biological processes including cell adhesion, migration, angiogenesis, differentiation, tumor growth and metastasis (Colognato and Yurchenco, 2000; Miner and Yurchenco, 2004). Laminins contain a single α -, β - and γ -chain which assemble via their coiled-coil domains into a cross-shaped trimer. To date, 5 distinct α -chains, 3- β chains and 3- γ chains have been shown to form at least 16 different isoforms named according to their chain composition (Aumailley et al. 2005). The distribution of individual laminin chains has been reported in the human and mouse intestine showing the prominent expression of laminin α 5 in the epithelial basement membrane during development and in the adult organ as well as around individual smooth muscle cells (Beaulieu and Vachon, 1994; Simon-Assmann et al. 1994; Lefebvre et al. 1999).

Function of laminin-511 has been first approached *in vitro* and have in general led to the conclusion that this isoform showed not only strong adhesive activity but also migration-promoting activity as

exemplified for keratinocytes (Pouliot et al. 2002), hematopoietic progenitor cells (Siler et al. 2000), endothelial (Doi et al. 2002) and intestinal epithelial cells (Turck et al. 2005). More precise functions of the laminin $\alpha 5$ chain has been addressed, at least partly, by creation of mouse with null mutations of the laminin $\alpha 5$ gene (Miner et al. 1998). Homozygous laminin $\alpha 5$ mice die around E17 with multiple tissue defects, including exencephaly, craniofacial, lung, renal, tooth, hair follicle developmental abnormalities as well as alterations in neural crest cell migration (Miner et al. 1998; Miner and Li, 2000; Nguyen et al. 2002; Li et al. 2003; Coles et al. 2006; Fukumoto et al. 2006). In the intestine, we showed that laminin $\alpha 5$ chain has a crucial role in the process of embryonic intestinal folding, in the development of the normal musculature and the onset of mucus epithelial cells (Bolcato-Bellemin et al. 2003). The effects of laminins on cellular behavior depend on the receptors that participate in intracellular signaling. Three major transmembrane receptor types are responsible for cell binding to laminins: the integrins (principally the $\beta 1$ - and $\beta 4$ -integrins), the dystroglycan complex and the Lutheran-glycoprotein (Durbeej et al. 1998; De Arcangelis and Georges-Labouesse, 2000; Parsons et al. 2001; Hallmann et al. 2005; Sgambato and Brancaccio, 2005). Therefore, it is highly possible that $\alpha 5$ -containing laminin isoforms such as laminin-511 or laminin-521, present in the intestine, may be instrumental in the localization, expression or activity of specific signaling pathways proteins.

Gene expression profiling has emerged as a powerful tool to explore the intricate signaling pathways. This strategy has been often applied on cell line models in order to define a pathway that could be triggered by defined stimuli such as cytokines (Iyer et al. 1999; Perou et al. 1999). Little is known about the downstream targets of extracellular matrix components *in vivo*. Therefore specific inactivation of basement membrane molecules in mice combined with microarray analysis should help to elucidate the intracellular signal transduction cascades activated downstream of these molecules and to identify target genes involved in the extracellular matrix-cell interactions. The goal of our present study is to apply the expression profiling technology to the study of a gene-targeted mouse model -laminin $\alpha 5$ knock-out mouse- with abnormal tissue defects in order to uncover specific regulatory genes triggered by laminin-511 and implied in intestinal development.

Materials and Methods

Animals and epithelial/mesenchymal intestinal dissociation

Laminin $\alpha 5$ -deficient mice were generated by Miner et al. (1998) and were bred on the C57BL/6J genetic background. Mice were genotyped by PCR as described (Miner et al., 1998). No homozygotes lived past embryonic day 17. Embryos were removed by caesarean section from day 13.5 to 15.5 of gestation, with the day on which a vaginal plug was found considered day 0.5. Segments of small intestines were immediately processed for subsequent analysis. For epithelial/mesenchymal dissociation, 13.5-day fetal embryonic intestines from wild-type or laminin $\alpha 5$ $-/-$ mice were dissected out. Mesenchyme was separated from the endoderm after incubation of the intestinal segments in a 0.03% solution of collagenase (1 hour at 37°C). The intestines were opened lengthwise with a microscalpel and then the endoderm can be pushed out of the mesenchymal gutter with forceps (Simon-Assmann and Kedinger, 2000). All experiments were performed in accordance with institutional guidelines for animal care.

RNA extraction

Intestinal segments were immediately processed in RNA Later (Ambion); RNA was then extracted using the Tri Reagent (Molecular Research Center Inc.) according to the recommendations of the supplier with a slight modification: the mixture was first centrifuged for 5 min at 12,000 g. Total RNA was subjected to an additional phenol/chloroform 5/1 (V/V) extraction. RNA concentration was determined by optical density at 260 nm. The integrity and purity of each RNA sample was checked by microcapillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Massy, France).

Screen of cDNA microarrays and data analysis

cDNA microarray preparation

The microarrays used for the transcriptome analysis contained 10,752 murine cDNA clones obtained from five different cDNA bank sources, corresponding to 2150 genes. Information on the different banks can be found in Benhamouche et al. (2006). Plasmid templates for the 10,752 clones were isolated from bacterial clones and inserts amplified in PCR reactions. The PCR

products were checked on agarose gels and purified by filtration on 96 well MAFBNOB50 multiscreen filter plates (Millipore, Bedford, MA), then dried up by evaporation at room temperature in a speedvac® (SC210A, Savant Instruments, Holbrook, NY), resuspended in 75 % formamide/25% milliQ water at a final concentration of 0.5µg/µl and incubated for 48 h at 4°C under slight agitation. The products were transferred to a 1536 well plate (#3950, Corning, NY). A Microgrid II robot (Genomics Solutions, Cambridge, UK) was used to print each product on ultraGAPS Coated Slides (# 40004, Corning Ltd) at 20-22°C and in 45% relative humidity. Arrays were dried 48 h in a dessicator; then DNA was cross-linked to the slide by UV irradiation (600 mJoules) in a UV2500 Stratalinker™ (Stratagene, La Jolla, CA). The slides were then stored at room temperature in a dessicator until hybridization. Replicates of the same spot (cDNA probe) were realized (well spaced and not adjacent on the slide) in order to monitor the quality of the experimental data.

Preparation of fluorescent probes and hybridization

Microarray analysis was performed on total RNA extracted from control and from laminin α 5-deficient intestines taken at embryonic day 15.5. The microarray experiments were performed in quadruple, corresponding to 4 different litters, with independently prepared RNA from mutant and wild-type embryonic intestines. For each RNA sample, a dye-swap (flip-flop) labeling and hybridization was performed using a common reference RNA sample corresponding to 15.5-day embryonic intestines of C57B1/6J mice.

Cy3 and Cy5 cDNA probes were prepared by reverse transcribing 10µg total RNA for 2 hours at 42°C (400U SuperScript II from Gibco, 1X reverse transcription buffer, 0.5mM DTT, 2µg anchored oligodT: T₂₀VVN, 500µM dATP, 500µM dCTP, 500µM dGTP, 100µM dTTP and 0.1mM Cy3- or Cy5-dUTP in a 30µl reaction). The reverse transcription was stopped by a 5 minutes heating at 70°C and RNA was degraded by RNase A (4µg) for 45 min at 37°C. A small fraction of the probes was loaded on a 1% agarose gel to check that the cDNA synthesis worked properly. The Cy3 and Cy5 reverse transcription reactions were mixed together, and then purified and concentrated using Microcon YM-30 (Millipore). Cy3 and Cy5 purified probes were resuspended in 40µl of hybridization solution (50 % formamide, 4X SSC, 0.6 % SDS, 5X Denhardt solution, 0.25mg/ml of mouse Cot-1 DNA, 1mg/ml salmon sperm DNA and 1mg/ml poly(dA) for hybridization). Before hybridization, this probe solution was incubated for at least 45 min at 46°C after a 2 min denaturation at 95°C (pre-annealing).

The slides were then immersed in a prehybridization solution (50% formamide, 4X SSC, 0.1% SDS, 0,1% BSA fraction V) for at least 30 min at 46°C. After several rinses of the prehybridized

slides by immersion in ultrapure water, the solution of pre-annealing probes was applied between slide and cover glass. The coverslip was sealed with rubber cement. Hybridization was performed in a humid chamber overnight at 46°C. Prior scanning, three posthybridization washes were performed (first wash : 2X SSC, 0.2% SDS for 5 min at 65°C; second wash : 2X SSC for 3 min at room temperature and third wash : 0.2X SSC for 3 min at room temperature).

Scanning and Quantitative image analysis

Arrays were scanned using a ScanArray 4000 (Perkin Elmer). with confocal scanner and lasers operating at 633 nm and 543 nm to excite Cy5 and Cy3, respectively. Raw numerical data were extracted from Cy3 and Cy5 images using Imagene 4.0 (BioDiscovery). Mean values of the fluorescent signal obtained for each spot and each fluorochrome were used for data analysis. Intra-slide normalization was performed using a method based on invariant rank genes and LOWESS fitting using the Elea software (Tseng et al. 2001; <http://www-microarrays.u-strasbg.fr/base.php?page=dataAnalysisNormE.php>). The normalised ratio of RNA sample (control or mutant) to reference RNA (\log_2) was calculated, and this ratio was directly used for the comparison of different samples.

Semi-quantitative and quantitative RT-PCR

3 μ g of total RNA were treated with 1 unit of DNase I (Boehringer Mannheim) 15min at room temperature in 20mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂. DNase was inactivated by EDTA (final concentration: 8.3 mM) 15 min at 65°C. After initial denaturation of the total RNA with 50 pmoles of oligo-dT during 5 min at 75°C, single-stranded cDNA was synthesized for 1 hour at 42°C in 25 μ l containing 10 units of AMV reverse transcriptase (Finnzymes, Finland), 0.8 mM of each dNTP (Invitrogen), in the 1x buffer supplied with the enzyme.

For semi-quantitative PCR, after denaturation of the enzyme (5 min at 95°C), the PCR reactions were performed in a total volume of 20 μ l, containing 1 μ l of cDNA solution, 50 pmoles of primers and with the Red'y Star Mix (Eurogentec) using an iCycler apparatus (Bio-Rad). The primers used are described in table I. The general conditions for PCR were then: initial denaturation at 95°C during 10 min followed by 25 to 40 cycles (depending of the pair of primers used) with denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing temperature (55-63°C) for 30 seconds and elongation at 72°C for 1 min. A final elongation of 7 min at 72°C was performed at the end of cycling. Control PCR was performed directly on RNA without the step of cDNA synthesis: no amplified DNA fragment was detected in this case. PCR fragments were loaded on 3% (w/v)

agarose ethidium bromide stained gels, and analyzed using gel Doc 1000 apparatus (Bio-Rad). The 36B4 ribosomal gene served as a standard for sample normalization. Intensity comparison was made during the initial phase of DNA synthesis. Determinations were performed on at least 5 paired intestinal control and knock-out samples taken from distinct litters.

For quantitative real-time PCR analysis, we used the LightCycler™ system (Roche Molecular Biochemicals) and FastStart DNA Master Mix SYBR Green I (Roche Diagnostics) according to the recommendations of the supplier. The primers are listed in table I. The PCR conditions were: 95 °C for 8 min, followed by 45 amplification cycles with denaturation at 95 °C for 20 s, hybridization at 62 °C for 20 s and elongation at 72 °C for 20 s, using the maximum temperature transition rate of 20 °C/s. Fluorescence measurements were taken at the end of the elongation phase. Each sample was measured in duplicate. Standard curves for both the gene of interest and the endogenous control were obtained. A standard curve was derived from serial dilution of a pool of cDNA from the samples analyzed. The specificity of the PCR products was assessed by generating a melting curve and by agarose gel electrophoresis. Comparative CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method) [16] was used with the LightCycler™ software (Roche Molecular Biochemicals) to quantify the cDNA of interest relative to the reference PBGD (porphobilinogen desaminase) cDNA. Amplification efficiency (E) was calculated from the slope of the regression line ($E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$) and were higher than 80%. The relative amount of cDNA of mutant samples versus controls is given by $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, where $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{mutant}} - \Delta\text{CT}_{\text{control}}$ and each $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{gene of interest}} - \text{CT}_{\text{reference}}$. Using this method, values above 1.5 or below 0.5 correspond to difference in gene expression. Data are represented as ratios of values (means \pm SEM) obtained using independent prepared RNA from control and knock-out samples following nine to twelve pairwise comparisons. Statistical analysis was performed using the paired Student t test; using this method, $p < 0.05$ was considered significant.

RNA in situ hybridization

In situ hybridization of Msx1-labeled probe on frozen sections of E14.5 mouse embryos was performed essentially as described by Gradwohl et al. (1996). Briefly, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C for 6h, equilibrated in 20% sucrose in PBS at 4°C overnight, frozen in OCT on dry ice and then cut in 10- μm -thick sections. Thawed sections were hybridized with the probe in a hybridization buffer containing 50% formamide and 10% dextran sulfate at 65°C for 72 hr. Sections were washed with washing buffer containing 50% formamide and 0.1% Tween 20 at 65°C. Sections were then incubated with an alkaline phosphatase-coupled anti-digoxigenin antibody (Boehringer, Mannheim), washed and processed with NBT/BCIP

(Boehringer, Mannheim). The Msx-1 antisense RNA probe (probe provided by D R E. Hill, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK) was synthesized from a 880pb cDNA using the T7 RNA polymerase.

Cell cultures

Transimmortalized mouse intestinal cells (m-IC_{Cl2}; Bens et al. 1996) were maintained in culture at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in DMEM/Ham F12 medium (Gibco) supplemented with 2,4 g/l D-glucose (Sigma), 5µg/ml transferrin (Sigma), 50nM dexamethasone (Sigma), 5µg/ml insulin (Sigma), 30nM sodium selenite (Sigma), 1nM triiodothyronine (Sigma), 10ng/ml epidermal growth factor, 2% fetal calf serum and 1% peni-streptomycin. Mesenchymal primary cultures were derived from 13-day embryonic intestines from wild-type or laminin α 5 $-/-$ mice after collagenase treatment as described previously (Olsen et al. 2000). Muscular-derived primary cell cultures were obtained from adult small intestine as follow: first removal under the dissecting microscope of the outer muscular layer using forceps; after having minced with scissors the muscle fragments, they were incubated in a collagenase/trypsin solution prepared in RPMI medium (collagenase XI, Sigma, 300U/ml; trypsin, Calbiochem, 0.1 mg/ml) for 1 hour at 37°C under shaking. After centrifugation (900g) the cells were transferred to collagen-I cultured dishes and cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (40µg/ml of gentamycin). After four days, muscular cells were passaged using 0.01% trypsin (Gibco-BRL) /2 mM EDTA treatment and were used until the 5th passage.

Akt activity assay

After an overnight serum starvation, m-IC_{Cl2} and muscle-derived primary cells were detached from culture dishes with 0.05% trypsin, washed with serum-free medium containing 1% BSA and resuspended in the same medium. Cells were kept in suspension for 90 mn at 37°C on a rotator. 7×10^5 cells/well (6-well dishes) were then allowed to spread on tissue culture dishes coated or not with laminin-511 or laminin-111. Laminin-111 and laminin-511 coatings were performed as previously described (Turck et al. 2005). Control of Akt activation was performed by adding EGF (0.02µg/ml; Sigma) and insulin (5µg/ml; Sigma) to the culture medium. In specific experiments, wortmannin (Calbiochem), a PI3Kinase inhibitor, was added at a final concentration of 1.5µM. Dose-response curves were determined in a first step to determine the optimal concentration of the inhibitor. After 150mn of culture, cells were washed and solubilized in Tris 50mM pH 8 containing

1% NP40, 1⁰/₀₀ (v/v) protease inhibitors and 1% (v/v) phosphatase inhibitors (Sigma). The cell lysates were clarified by centrifugation at 16,000g at 4°C for 10mn and subjected to electrophoresis.

Western blot analysis

Intestines from E13.5 and E15.5 wild-type and laminin $\alpha 5^{-/-}$ animals and separated E13.5 intestinal endoderms or mesenchymes from wild-type and laminin $\alpha 5^{-/-}$ mice were homogenized with a Potter tissue grinder in Laemmli buffer containing 2% SDS (w/v) and 20 mM DTE and subsequently sonicated. After centrifugation at 13 000 g for 10mn, the supernatant was collected. Proteins (10 to 70 μ g) were incubated at 100°C for 10 minutes. The proteins were then separated by SDS-PAGE analysis (10% gels) and subjected to Western blotting using the following antibodies: rabbit polyclonal antibodies to Akt (catalog number 9272, diluted to 1/1000; Cell Signaling), rabbit polyclonal antibodies to Akt2 (diluted to 1/500; kindly provided by Dr B.A Hemmings, Friedrich Miescher Institute, Basel; Yang et al. 2003), mouse monoclonal antibodies to Phospho-Akt (Ser473; catalog number 4051, Cell Signaling; diluted to 1/1000), rabbit monoclonal antibodies to PTEN (138G6, Cell Signaling; diluted to 1/1000), mouse monoclonal antibodies to actin (Mab1501R, Chemicon; diluted to 1/15,000). After incubation with goat anti-mouse or anti-rabbit alkaline phosphatase-linked secondary antibodies, the blots were developed using the ECL (enhanced chemiluminescence substrate, Amersham Life Science Ltd.). Quantification was determined using the Quantity One software (BioRad, CA). The MagicMark Western Standard (Invitrogen, Cergy Pointoise, France) was used as molecular weight marker.

Proliferation and migration assays, detection of apoptosis

For proliferation assays, mouse m-IC_{Cl2} intestinal cells were seeded at 15×10^4 cells/0.7 cm² chamber (Lab-Tek Permanox Chamber Slide, Nunc) coated or not with laminin-511 and allowed to attach for 24h. After PBS washes, quantification of the proliferative cells was performed using BrdU staining. Briefly, 10 μ M BrdU (Sigma-Aldrich) was added to the culture media 1h before fixation. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 10mn and then treated with 2M HCl for 60 mn at 37°C to denature DNA. After washings, anti-BrdU–fluorescein (Roche, IN, USA) diluted to 1/10 in PBS with 0.1% (w/v) BSA was added and incubated for 60mn at room temperature, protecting cells from light. Nuclei were then labeled with DAPI (Sigma-Aldrich). The number of

positive cells was counted under x10 and x40 objective in each of respectively five and ten randomly chosen fields using an epifluorescence microscope (AX 60, Olympus Optical Co, Hamburg, Germany). Experiments were performed in triplicate (4 to 6 independent assays/experiment).

For survival assay, mouse m-IC_{C12} intestinal cells were first cultured overnight in serum-free medium. Then, cells were seeded into eight-chamber slides at a density of 15×10^4 cells/chamber on laminin-511 or not, for 6h before beginning the 1hour-treatment with H₂O₂ (200 μ M) in DMEM/HamF12 medium deprived of serum. This dose of H₂O₂ was established in a first time by a dose-response curve (100 to 400 μ M). In some cases, 1.5 μ M wortmannin was added at the time of cell seeding. Quantification of cells was then performed at 24 hours using the MTS (tetrazolium compound, CellTiter 96^R AQueous One solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI) as previously described (Turck et al. 2005). In parallel, the proportion of cells undergoing apoptosis was determined by immunodetection of cleaved caspase-3 using rabbit polyclonal antibodies (RD Systems) diluted at 1/500 and incubated on cells overnight at 4°C.

For cell migration assays, 2.5×10^5 cells were plated into 6-chamber uncoated dishes or on dishes containing a laminin-511 enriched matrix. Dishes were immediately leaned allowing to the cells to attach on one side of the dish. After 3 hours, the dishes were set upright again to start the migration assay. Mitomycin C (Sigma, 5 μ m/ml) was added to the culture medium to avoid cell proliferation. The limit of the cells was marked and images were taken 24h later. Each experiment was performed in duplicate.

Immunostaining

For indirect immunofluorescence staining of β -catenin, dissected intestines were first fixed in 4% paraformaldehyde for 6h, placed overnight in 20% sucrose and then embedded in Tissue-Tek (Sakura, Labonord) and frozen on dry ice; they can be stored at -80°C until used. Transverse sections cut at -19°C (7 μ m thick) were placed onto superfrost/plus slides (Kindler GmbH, Freiburg, Germany). Sections were equilibrated in sodium citrate buffer (pH6), subjected to microwave oven (750 W, 10mn) and incubated with the mouse monoclonal β -catenin antibody (BD Transduction Laboratories; diluted 1/200) in PBS containing 0.1% Triton X100 and 5% normal goat serum. Detection of myoD1 and of α smooth muscle actin was performed on intestinal mesenchymal and muscular cells respectively. Cells were grown on coverslips, prefixed 10mn in 1% paraformaldehyde and permeabilized 10mn with 0.5 % Triton X-100 before incubation with

mouse NCL-MyoD1 monoclonal (Novocastra; diluted 1/20) or α -smooth muscle actin (Sigma; diluted 1/400) antibody in PBS for 3h at room temperature or overnight at 4°C. Incubations with primary antibodies were carried out overnight at 4°C in a moist chamber. Bound antibodies were visualized with anti-mouse (1:250; Biorad) secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. DAPI (diluted 1/30 000) was used to visualize nuclei. After mounting in a glycerol/PBS/phenylenediamine solution, sections or cells were examined using an epifluorescence microscope (AX 60, Olympus Optical Co, Hamburg, Germany). Control sections were processed as above with omission of the primary antibodies.

Results

Lack of the laminin α 5 chain has a profound effect on the intestinal gene expression signature

Microarray analysis was performed using RNA extracted from whole E-15.5 intestines of laminin α 5 deficient mice compared with intestines of wildtype mice at an equivalent stage that express laminin α 5 chain. This stage was chosen as (i) we could show previously that differentiation of smooth muscle cells and of mucus cells were affected the most at this period just before lethality due to the absence of laminin α 5 chain (Bolcato-Bellemin et al. 2003), (ii) this embryonic period is of keen interest due to onset of villus morphogenesis (Kedinger et al. 2000). The microarray experiments were performed in quadruple. The cohybridization scheme used in the cDNA microarray experiments effectively controls between-array variation through data normalisation against a common reference, thereby generating inter-comparable data among multiple samples. Independent hybridizations to different microarrays with mRNA samples from intestines harvested from 4 different litters showed a good correlation as control and laminin α 5^{-/-} intestines were found segregated although there were some differences in the severity of the phenotype between mutants (figure 1).

In a first step, we applied the following criteria: (i) the average fold change in expression between normal and laminin α 5^{-/-} intestines must be at least 2; (ii) a 2-fold difference must be observed independently on two separate microarray slides. Comparison of the gene expression profiles between the laminin α 5^{-/-} and the control intestinal samples yielded 192 up-regulated and 164 down-regulated genes. These differentially expressed genes were categorized based on their known functions by conducting a comprehensive search of the literature using PubMed; some of these genes are listed (figure 2). As these genes have diverse physiological and cellular functions, this functional grouping primarily serves to facilitate data visualization. Many genes that are modulated in laminin α 5^{-/-} embryos encode signaling molecules or transcription factors (figure 2). Among the up-regulated genes, 27% (51 genes) include genes involved in signal transduction (signaling molecules belonging to Wnt and PI3K/Akt pathways) and 17% (32 genes) are involved in gene transcription. In this last category epithelial as well as mesenchymal transcription factors were found, some of them being quoted in figure 2. Interestingly is the fact that 4% of genes belong to the adhesion receptor family including in particular three integrin subunits (α v, α M and β 4) and the 67kd laminin-111 receptor. In the down-regulated class of genes, signaling molecules are again the most affected (17%). In addition, in this category 23 genes (14%) were genes associated to

epithelial or muscle cell differentiation (see figure 2). Considering the large number of genes that were found, we applied a second step of selection. Only genes that showed >2-fold expression changes between control and knock-out samples following at least three pairwise comparison were studied further. This resulted in 25 up-regulated and 15 down-regulated genes in laminin $\alpha 5$ $-/-$ intestines in comparison to wild-type intestines (listed in Table II) with changes in expression ranging from 2.0 to 8.6 fold.

Laminin $\alpha 5$ chain regulates expression of genes involved in cell differentiation

Among those genes that are the down-regulated in the absence of laminin $\alpha 5$ chain, we found genes involved in differentiation of the epithelial compartment or genes encoding markers of functional differentiation. This class includes molecules involved in the cholesterol metabolism such as Fabp1 and Fabp2 (Fatty acid-binding protein 1 and 2), Apo1 and Apo4 (Apolipoprotein 1 and 4) and HmgCs2 (Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2). Semi-quantitative RT-PCR (representative gels are shown in figure 3A) confirmed the decrease of these transcripts in the laminin $\alpha 5$ $-/-$ compared to the wild-type intestines; the expression levels were similar to those obtained by microarray experiments (ranging from 1.5 to 3.1 fold decrease; n=5). Inhibition of laminin $\alpha 5$ chain also led to the down-regulation of mRNA encoding brush border enzymes such as the zinc metalloprotease Mep1a (Meprin) and a serine exopeptidase DPP4 (dipeptidyl peptidase IV).

Despite the fact that the laminin $\alpha 5$ $-/-$ intestines displayed smooth muscle defects (Bolcato-Bellemin et al. 2003), only few genes characteristic of the mesenchymal or of the muscle compartment were found to be repressed significantly. We found that FHL1 and desmin (encoding a muscle-specific intermediate filament) as well as NPY (neuropeptide Y) and CCKAR (encoding the cholecystokinin A receptor), two molecules implied in the control of gut motility were down regulated in laminin $\alpha 5$ knock-out intestines in comparison to wild-type intestines. NPY, a neuroregulatory peptide known to regulate gene expression in enterocytes, exhibited the highest level of repression with a 8-fold down regulation. The down-regulation of FHL1 (a regulator of muscle cell differentiation; Brown et al. 1999), NPY and CCKAR in the laminin $\alpha 5$ $-/-$ intestines was verified by RT-PCR experiments (figure 3B). Desmin mRNA expression was also decreased in the laminin $\alpha 5$ $-/-$ embryonic intestines mutant (figure 3B) which is in accordance with the already noted decreased protein expression (Bolcato-Bellemin et al. 2003).

Laminin $\alpha 5$ chain regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway

Among the genes found to be deregulated in laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines, are genes belonging to the Wnt/ β -catenin signaling pathway: axin1, Dvl1 and Dvl2, Fzd2, sFRP2 and Wnt 10b (Figure 2). We also found 3 genes known to be target genes of the Wnt pathway: Msx1 (Willert et al. 2002), MyoD1 (Tajbakhsh et al. 1998) and Pitx2 (Kioussi et al. 2002). We also investigated the expression of Hlx1, since this gene is implicated in epithelial-mesenchymal interactions in the gut and in the development of the enteric nervous system (Hentsch et al. 1996; Bates et al. 2006). Real-time PCR was used to verify the laminin $\alpha 5$ -dependent expression of these genes. Expression of 4 genes (Fzd2, Hlx1, Pitx2, Sfrp2) was higher in the knock-out intestine in comparison to the wild-type intestine confirming the microarray data (Figure 4A, Figure 2, Table II) although the differences were not significant for Fzd2. By *in situ* hybridization we confirmed upregulation of the transcription factor Msx1 in the endodermal compartment in the laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestine (Figure 4B). MyoD1, a classical described skeletal muscle-specific transcription factor was up-regulated in the laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestine as assessed by the presence of MyoD1- positive cells on cultured intestinal mesenchymal cells (Figure 4B) confirming the microarray data.

Hlx1, Pitx2 and Sfrp2 expressions were reported previously in the fetal intestine (Stegmann et al. 2006). We confirmed and extended these findings. Quantitative RT-PCR experiments were performed on tissue samples in which endodermal and mesenchymal cells were separated physically at E 13.5. Data presented in Figure 4C (expressed as relative expression between mesenchymal versus endodermal RNAs) revealed that Pitx2, although expressed by both tissue compartments, is mostly an endodermal product while Sfrp2 and Hlx1 are found in great majority or even exclusively in the mesenchymal compartment. The mesenchymal/endodermal ratio of these genes altered upon loss of the laminin $\alpha 5$ chain shows that the observed changes can not be attributed to a particular compartment. By microarray, we found a 2-fold decrease in Wnt10b expression in laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines as compared to control intestines. Yet, we could not confirm this decrease neither by quantitative RT-PCR experiments nor by immunocytochemistry (not shown) as this gene was expressed at very low levels in control intestine (fall below the level of reliable detection for the assay). The other Wnt genes shown to be expressed in the embryonic murine intestine such as Wnt 4, Wnt5a, Wnt 11 (Lickert et al. 2001) were not modified on the microarrays in the absence of laminin $\alpha 5$ chain.

Laminin α 5 chain regulates expression and activity of the survival factor Akt

The microarray analysis revealed that expression of genes belonging to the PI3K/Akt signaling pathway such as *Rasgrp2*, *Pik3cd*, *Pikc2g*, *Akt2* (see figure 2) was modified in the absence of laminin α 5 chain. We focused our attention on the serine-threonine protein kinase Akt, since it regulates cellular survival. The microarray data showed that *Akt2* mRNA expression was downregulated (4.4-fold decrease) in E15.5 intestines when laminin α 5 chain is absent (see figure 2) while *Akt1* and *Akt3* mRNA levels were not altered. Western blot analysis revealed that Akt protein expression was lower in laminin α 5^{-/-} intestines than in wild-type intestine (figure 5 A). Moreover by using an antibody specific for active Phosphoser473-Akt we found that Akt phosphorylation levels were lower in the laminin α 5^{-/-} intestine as compared to wild-type intestine (figure 5A). To investigate in which compartment Akt levels are lowered in the laminin α 5 knock-out intestine, we used tissue prepared from separated endoderm and mesenchyme and determined Akt expression by immunoblotting. Levels of Akt, that were higher in the mesenchyme than in endoderm, decreased in laminin α 5^{-/-}-mesenchyme, while this expression did not vary appreciably for the endoderm (Figure 5B).

Since expression of laminin α 5 was correlated with an apparently disturbed expression of Akt and of its activation, a functional assay system was used to investigate intestinal cell behavior in response to laminin-511 by examining the PI3K/Akt pathway. As embryonic intestinal endodermal cells have a limited time viability in culture (Simon-Assmann and Kedinger, 1994) we used a murine intestinal epithelial cell line (m-IC_{C12}) that exhibits a crypt undifferentiated cell phenotype (Bens et al. 1996). In parallel, we generated muscular-derived primary cell cultures from adult intestines that could be used up to 3 passages. Their muscle phenotype was verified by immunostaining using anti- α smooth muscle antibodies (not shown). The expression of the activated form of Akt was examined in epithelial and muscle cells that were seeded on laminin-511 (containing the α 5 chain) and compared to laminin-111 or to uncoated dishes. As shown in figure 6A, Akt phosphorylation occurred in the murine m-IC_{C12} epithelial cell line seeded on laminin-511 as well in epithelial cells (seeded on plastic) which have been stimulated by EGF and insulin as positive controls. Addition of wortmannin, specific inhibitor of the PI3-Kinase, abolished Akt phosphorylation in cells cultured on laminin-511 likewise those stimulated by growth factors. PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) has been shown to negatively regulate the PI3K/Akt signaling pathway. The possible effect of laminin-511 coating on PTEN expression was examined by immunoblot experiments. No changes in expression level of PTEN

was detected when m-IC_{C12} were seeded on laminin-511 as compared to uncoated dishes (data not shown). In contrast to epithelial cells, laminin-511 did not stimulate Akt phosphorylation in muscle cells as compared to those cultured on plastic dishes while stimulation occurs in presence of EGF and insulin (Figure 6B). Phase contrast microscopy revealed that laminin-511 stimulated the spreading of epithelial as well as of muscle cells. Yet, blockage of Akt activation by wortmannin was found to abolish the effect of laminin-511 on epithelial cells, as evidenced by cell rounding; in contrast, this inhibitor exerted no effect on muscle cells (Figure 6). Altogether these data provide evidence that laminin-511 activates Akt in intestinal epithelial cells through the PI3Kinase pathway.

Laminin-511 prevents apoptosis and activates migration of intestinal epithelial cells

A stimulatory effect of laminin-511 on proliferation was observed for the murine m-IC_{C12} intestinal cells as assessed by BrdU experiments (figure 7A). Linked to the fact that Akt is known to be implicated in epithelial cell survival, we examined the potential role of laminin-511 for an anti-apoptotic effect. We induced apoptosis using hydrogen peroxide (H₂O₂; 200μM) and examined cell survival with or without wortmannin using the MTS test. The addition of laminin-511 strongly reduced the number of apoptotic cells as shown by the ineffective action of H₂O₂ compared to cells seeded on plastic dishes where only 20% of cells were still viable. This anti-apoptotic effect of laminin-511 was completely inhibited by wortmannin (Figure 7B). By tracking cell locomotion for 24h, we found that the motility of the m-IC_{C12} epithelial cells seeded on laminin-511 was significantly increased relative to cells plated on plastic (figure 7C). This migration occurs even in the presence of DNA synthesis inhibitor mitomycin indicating that this effect is independent of cell proliferation. Of note is the fact that this enhanced migration on laminin-511 is not abolished by the addition of wortmannin. Altogether, these data show that one of the functions of laminin-511 is to provide migration and cell survival signals to epithelial cells; this latter function is dependent on the PI3-kinase pathway.

Discussion

Strong evidence supports the role of the laminin $\alpha 5$ chain in development, as laminins containing $\alpha 5$ chain are detectable at significant levels in peri-implantation embryos (Klaffky et al. 2001). Around E7, laminin $\alpha 5$ chain is found in two basement membranes, the embryonic basement membrane and the Reichert's membrane. *Lama5*^{-/-} embryos die at around E 16.5 and exhibit two specific visible developmental defects associated with disruptions in the ectodermal basement membrane, exencephaly (open brain) and syndactyly (defects in digit septation) (Miner et al. 1998). Furthermore we could show intestinal defects affecting both muscle and epithelial compartment in mice lacking laminin $\alpha 5$ chain (Bolcato-Bellemin et al. 2003). In the present paper, we provide a mechanistic bridge between laminin $\alpha 5$ gene deficiency and the physiological phenotypes by performing gene expression profiling. Two major results arise from the present study: (1) loss of laminin $\alpha 5$ chain affects the intestinal gene expression signature and (2) laminin $\alpha 5$ regulates Wnt signaling and PI3K pathways, leading to independent cell responses.

We used microarray analysis to profile the changes in gene expression that accompany the morphological modifications that we observed in the laminin $\alpha 5$ deficient intestines. In the process of cell/matrix interactions, receptors are intermediate elements that mediate cell adhesion to laminins. Several cellular receptors have been shown to interact with laminin $\alpha 5$ -containing molecules. Although preferential interactions seem to be cell type-specific, at least four integrin receptors ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$) and the Lutheran blood group glycoprotein are involved in adhesion to laminin-511. The absence of laminin $\alpha 5$ chain in embryonic intestines modifies the expression/localisation of some epithelial receptors: increase in RNA levels of the αv , αM and $\beta 4$ integrin subunits and of the 67kd laminin-111 receptor concomitantly to the decrease in Lutheran and $\alpha 3\beta 1$ expression (present work and Bolcato-Bellemin et al. 2003). This suggests that integrin expression itself might be regulated by basement membrane adhesion and that in the absence of $\alpha 5$ chain some of them might compensate for other decreased receptors.

Loss of the laminin $\alpha 5$ chain in the sub-epithelial and muscle basement membranes leads to extensive alterations in epithelial as well as muscle cell markers that accompany the maturation program of the intestine. Concerning the epithelial compartment, we show clearly a down-regulation of genes involved in digestion process (brush border enzymes) and in lipid metabolism and transport (fatty acid-binding proteins and apolipoproteins). These data show that, despite the fact that the morphology of the epithelial cells is not modified in the laminin $\alpha 5$ ^{-/-} embryonic

intestines (Bolcato-Bellemin et al. 2003), their differentiation are nevertheless affected. Linked to this observation, Interactions of epithelial cells with basement membrane components have been shown to modulate differentiation although up to now this was mainly showed by *in vitro* models as cell cultures (Katz and Streuli, 2007). For example, culture of adult intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) on different matrix substrates, such as laminin-111 or collagen IV, enhanced the expression of sucrase-isomaltase, a marker of cell differentiation (Basson et al. 1996; Turck et al. 2006). The differentiation process induced by laminin-111 requires the activation of the p38MAPK possibly activated by a β 1-integrin receptor (Turck et al. 2006).

During intestinal morphogenesis, a subset of mesenchymal cells differentiates into smooth muscle cells. This differentiation is accompanied by morphological modifications of the cells (elongation and alignment of some mesenchymal cells) and expression of smooth muscle markers. We show here that laminin α 5 chain is involved in the smooth muscle patterning or contraction as some genes characteristic of this compartment are down regulated in laminin α 5 deficient intestine (desmin, NPY, CCKAR). Interestingly at the opposite, we found in mesenchymal cells devoid of laminin α 5, an upregulation of MyoD, a transcription factor known mostly to control specification of the skeletal muscle cell lineage (figure 4). The exact significance of such an activation is not clear. This finding could argue for an activation of quiescent cells that would be re-activated in the damaged intestinal mesenchymal tissue due to the absence of laminin α 5 chain. Such a hypothesis fits with the fact that some MyoD-positive cells were detected in adult organs including intestine and that these cells have the capacity to differentiate when placed in a permissive environment (Gerhart et al. 2001). Furthermore, Wnts have the potential to activate, directly or indirectly, transcription of MyoD and to promote survival and expansion of a committed cell population (Cossu and Borello, 1999).

The deregulation of differentiation genes is probably a consequence of a modulation of laminin α 5-mediated signal pathways. In accordance to that, we found modifications of genes belonging to two pathways, Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt, and of target genes of these pathways. The Wnt/ β -catenin signal transduction pathway controls a variety of biological processes, including embryonic patterning. Activation of Wnt signaling has also been linked to the pathogenesis of colorectal cancer. Linked to loss of functional APC in over 80% of human colonic carcinomas, there is translocation of β -catenin to the nucleus. Accumulation of nuclear β -catenin is often used as an index of activation of canonical Wnt signaling. Yet, we did not see such evidence of β -catenin accumulation neither in the embryonic intestine undergoing morphogenesis (in accordance with Park et al. 2005) nor in the intestine devoid of laminin α 5 chain although Wnt signature genes have

been found in both situations (Park et al. 2005 and our present data). In the adult mature intestine, Wnt signaling is normally confined to proliferative immature cells located in the crypt region. This results mainly to activation of genes involved in cell proliferation such as c-Myc, cyclin D and sox9 (Kapoor et al. 2007). Surprisingly, in the developing fetal intestine Wnt activity appears only around E16 and only in postmitotic cells (Kim et al; 2007). Furthermore, the fact that TCF3 rather than TCF4 (the major TCF/LEF family member expressed in the adult intestine) is used during fetal life would suggest that Wnt signals would activate different target genes.

The absence of laminin $\alpha 5$ chain from the subepithelial and muscular basement membranes leads to a precocious activation of genes belonging to the Wnt pathway or of target genes with an increased expression of Pitx2 and Msx1 genes in the endodermal compartment and of Myod in the mesenchyme for example. Pitx2 is expressed in many tissues during development including the gut, which expression is found as soon as E9.5 in the mouse (Hjalt et al. 2000). Of interest is the fact that partial depletion of pitx2c mRNA in developing *Xenopus laevis* (Dagle et al. 2003) results in alteration of intestinal coiling. A complementary balance seems to be obvious in our laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines. Msx1 another β -catenin/TCF target gene (Giles et al. 2003; Sansom et al. 2004) is also up-regulated in the gut endoderm by the absence of laminin $\alpha 5$ chain (Figure 4). Members of the secreted frizzled (Fz) related protein family (SFRPs) are most commonly viewed as Fz antagonists, but have also been shown to act as agonists of the Wnt signaling pathway in some contexts (Jones and Jomary, 2002). SFRP2 mRNA has been associated with myogenesis and it was speculated that the expression of the SFRP2 gene is linked to satellite cell activation which is known to continue until reconstitution of muscle fibers (Levin et al. 2001). Gaining an understanding of how individual components of the Wnt/ β -catenin network influence the behavior of embryonic intestinal cells is an important area for future study.

Our microarray data on laminin $\alpha 5$ -deficient intestines completed by *in vitro* experiments using laminin $\alpha 5$ -containing substratum (laminin-511) argue for a role of cell-basement membrane interactions in modulating the PI3K/Akt signaling pathway. In the fetal intestine lacking laminin $\alpha 5$ chain, we found (1) up-regulation of genes known to be involved in the activation of Akt (Pik3cd, Pik3c2g), (2) decrease of global serine/threonine kinase Akt, of Akt2 as well as of the active Akt phosphorylated form. This could be explained by differential regulation in-between epithelial and mesenchymal cells in the intestine during fetal life but also in the mature intestine. In parallel to the down regulation of Akt kinases in the laminin $\alpha 5$ -deprived mesenchyme, we found indeed a decrease rate of cell proliferation in this compartment (Bolcato-Bellemin et al. 2003). Linked to technical problems inherent to embryonic cells mentioned in the result section, we

shifted to adult epithelial and muscle intestinal cells in order to decipher the relationship between laminin-511 and the PI3kinase pathway. We clearly show that laminin-511 mediates multiple biological functions to the cells: activation of cell spreading for intestinal epithelial (m-IC_{C12}) and muscle cells, increased proliferation/migration and anti-apoptotic effect for epithelial cells. Enhanced adhesion /proliferation on laminin-511 (named formerly laminin-10) has already been reported for human colon adenocarcinoma cells, keratinocytes or hematopoietic progenitor cells (for references see in Turck et al. 2005). Besides that, we now demonstrate that laminin-511 prevents apoptosis via a PIK-dependent kinase pathway and activates cell migration, this latter effect being independently of this pathway. Gu et al. (2002a) clearly showed that distinct survival signaling pathways are triggered by laminin-511 or fibronectin. While survival signals from laminin-511 are mainly through the PI3Kinase/Akt pathway (as in our conditions), those from fibronectin are conveyed by FAK (through the MEK/ERK pathway) when using cancer cells. Perturbation of β 1-integrin function (possible receptors of laminin-511) affects several signaling pathways among which PI3K and Ras although their impaired activity may not be direct (Faraldo et al. 2001).

The potential role of laminin-511 in cell migration fits with previous published data (Pouliot et al. 2001; Gu et al. 2002b). Using *in vitro* assays, Chia et al (2007) provide evidence for the functional relevance of laminin-511 and its integrin receptors in the metastatic process (that is linked to cell motility) in mouse and human breast cancer cells. We analyzed 15 malignant human colon tissues at different grades of malignity and compared the expression of the laminin α 5 chain to that present on the paired adjacent normal tissue at distance. Although we observed a large variability in the staining with anti-laminin α 5 antibody (Ritié et al. personal data), the epithelial basement membrane became more disrupted and less stained with increasing grade of the tumor. This could be due to proteolytic cleavage of the laminin α 5 chain leading to residual laminin fragments still biologically active to promote cell invasion as it was shown for other isoforms of laminins (for reviews see Ghosh and Stack, 2000; Marinkovich, 2007).

In conclusion, the results of the cDNA microarray data analysis in laminin α 5^{-/-} intestinal samples document the crucial role of this chain in both epithelial and mesenchymal cell differentiation and describe specific genes/pathways that may underlie the diverse multiple functions of laminin-511 in the intestine.

Table I: Sequences of the primers used for RT-PCR or RT-QPCR

Gene	Sequences (5' to 3')
36B4	ATG TGA AGT CAC TGT GCC AG
	GTG TAA TCC CTC TCC ACA GA
ApoA1	CAC GTA TGG CAG CAA GAT GAA CC
	TTC TGG AAT TCG TCC AGG TAG
Axin1	GA CTT GGA ACT CTC CGA GAC AGA
	AGT GCA CAG TAG TGA TGG TGT GC
CCKAR	TGCTCAAGGATTTTCATCTTCG
	ACCTTCAAAGCATGGGACTTT
Desmin	AGGAGGAGATCCGACACCTAA
	CTCGGAAGTTGAGAGCAGACA
Dvl1	CGA CCT GTG CAG TAA CCT CGC A
	CCA CTT GGT ACT GTG TGG TCT GA
Dvl2	GCT TAC CCT GGC TCC TCA TCT AT
	CCC ACT GGA ACC GTC ATT GTC AT
Fabp1	TCT CTT GCT GAC TCT CTT GTA GAC
	CTT TGA GCC ATT CAT GAA GGC AAT
Fabp2	ACA TCA GCT TAG CTC TTC AGC GTT
	ATG TGA TGA AGA GGA AGC TTG GAG
FHL1	TCG TGC CAG GAT TGT CCT TCA TAG
	CTG GCA TAA AGA CTG CTT CAC CTG
Fzd2	AGC AGG CGG CCG GGC AGC TA
	GTG GAA CTG GGC CGG TCC G
Hlx1	ACA GAC ATA CAA GCG GAA GCG CT
	TTA GAG TGC CGC CAC TTC ATC CT
Hmgcs2	CTT CCT GCG ATG CAT CTC ATC C
	CCA CTC TGC CCA AGA ATT GGC T
NPY	ACCCTCGCTCTATCTCTGCTC
	CGTTTTCTGTGCTTTCCTTCA
PBGD	AAC CCT TGT GAT GCT GTT GTC
	GAC GAT GGC ACT GAA TTC CT
Pitx2	CCA GCA AGG AAA GAA TGA GGA TGT
	ACT CG GGC TTC CGT AAG GTT GG
Sfrp2	CCA AGG TGT GTG AAG CCT GCA AA
	GGA GAT GCG CTT GAA CTC TCT CT
Wnt10b	Quiagen

Table II: Genes deregulated in E15.5 laminin $\alpha 5$ $-/-$ embryos determined by microarray analysis and sorted out consistently at least in 3 out of 4 experiments

Genes		Accession number	Rate
Upregulated genes			
Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	Mm.41171	2.2
Hlx1	H2.0-like homeo box 1	Mm.1347	2.0
Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	Mm.9911	2.6
Deaf1	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila)	Mm.28392	2.3
Sin3b	transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	Mm.2137	2.5
Clta	clathrin, light polypeptide (Lca)	Mm.198817	2.3
Rara	retinoic acid receptor, alpha	Mm.103336	2.2
Mapk14	mitogen activated protein kinase 14	Mm.4437	2.4
Kifc1	kinesin family member C1	Mm.197684	2.9
EST	RIKEN full-length enriched library, clone:B230309J24	Mm.40966	2.7
Cryaa	crystallin, alpha A	Mm.1228	2.4
Lhx1	LIM homeobox protein 1	Mm.4965	2.3
Elavl3	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)	Mm.390167	2.1
Fit3	FMS-like tyrosine kinase 3	Mm.194	2.4
Pscd2	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 2	Mm.19097	2.2
Sub1	Sub1 homolog (S.Cerevisiae)	Mm.41746	2.0
Kif3c	Kinesin family member 3C	Mm.7688	4.5
Apoc1	apolipoprotein C-I	Mm.182440	2.0
EST	clone IMAGE:3594956, mRNA	Mm.218722	2.0
Ebf1	early B-cell factor 1	Mm.4366	2.4
Ifng1	interferon gamma receptor 1	Mm.549	2.1
Fbxo2	F-box protein 2	Mm.262287	3.8
E2f5	E2F transcription factor 5	Mm.379	2.3
Mxd3	Max dimerization protein 3	Mm.20350	2.6
Klf4	Krüppel-like factor 4 (gut)	Mm.4325	2.3
Downregulated genes			
Ldb3	LIM domain binding 3	Mm.29733	8.6
Cpt2	carnitine palmitoyltransferase 2	Mm.29499	2.2
Epas1	endothelial PAS domain protein 1	Mm.1415	2.2
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Mm.10633	2.4
Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver	Mm.22126	3.1
Fabp2	fatty acid binding protein 2, intestinal	Mm.28398	3.2
Scnn1g	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma	Mm.35247	2.3
Apoa1	apolipoprotein A1	Mm.26743	2.8
Apoa4	apolipoprotein A4	Mm.4533	2.2
Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	Mm.27254	2.1
Cyp2j5	cytochrome P450, 2j5	Mm.12838	2.1
Sall2	sal-like 2 (Drosophila)	Mm.39487	6.2
Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	Mm.416125	2.1
Des	desmin	Mm.6712	2.4
Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25	Mm.7275	2.4

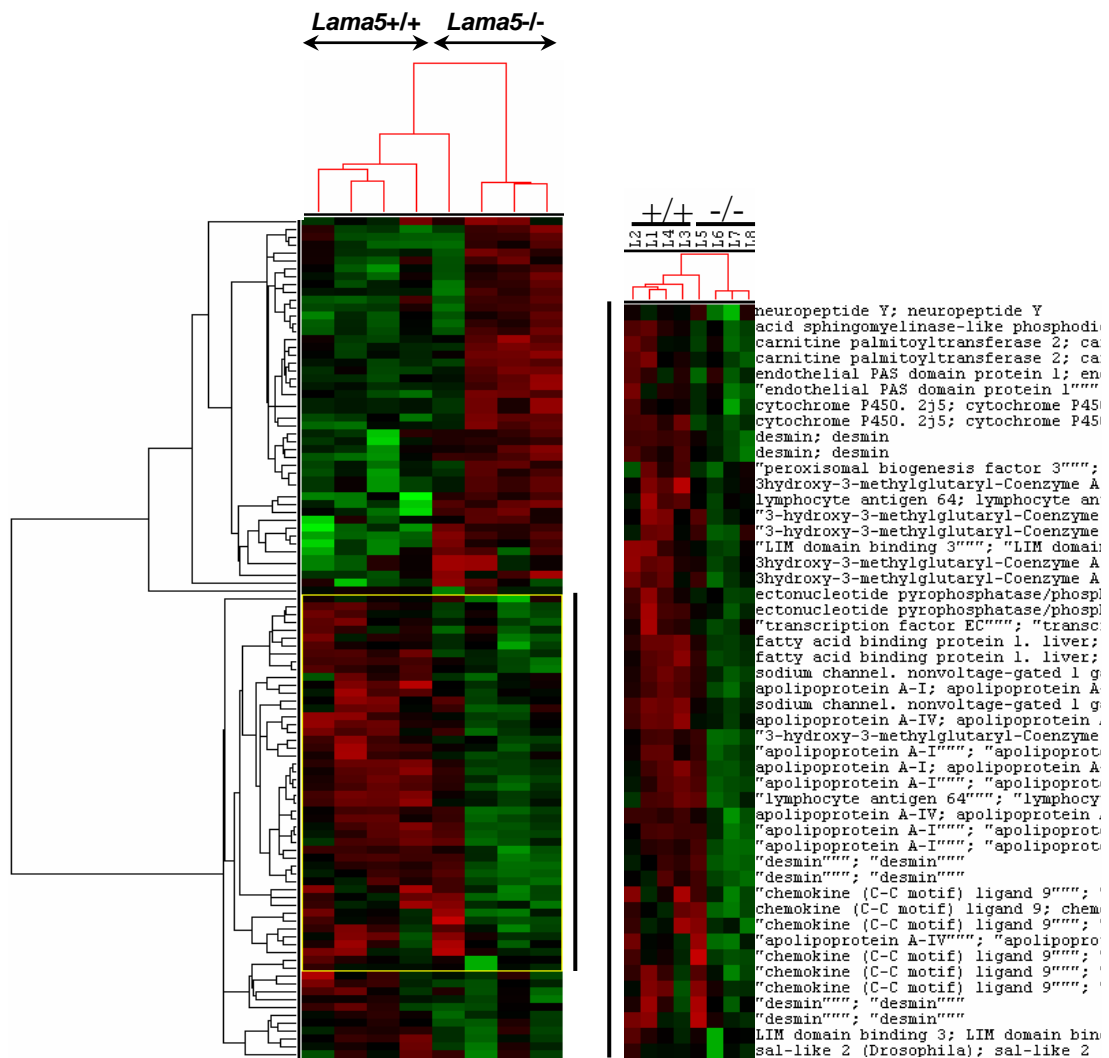
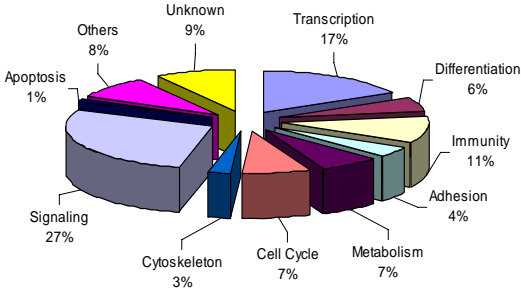


Figure 1: Laminin a5-specific gene clusters in intestinal tissue.

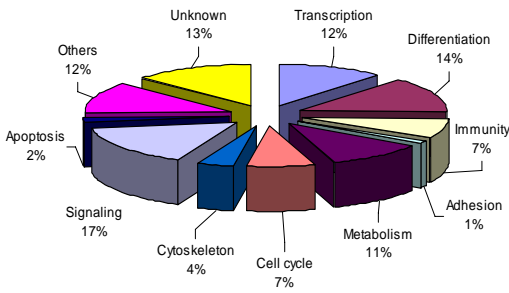
Selected clusters produced by a hierarchical clustering program are shown on the left. The top clusters generally follow a pattern of increased expression in laminin a5 $-/-$ intestines. In the bottom, clusters of genes are shown, the expression levels of which are reduced in knock-out intestines as compared to wild-type intestines (+/+). The branch lengths indicate the correlation with which genes were joined, with longer branches indicating a lower correlation. On the right, enlargement of a region with decreases in expression in mutants and with the listing of the corresponding genes. Each column represents a single experiment, and each row represents a single gene. The color-coding is as follows: red for increased expression, green for repressed expression, black for unaltered gene expression with the relative \log_2 (ratio) reflecting the intensity of the color. Note that the controls (+/+, L1 to L4) appear as a separate group distinct from the mutant group (-/-; L5 to L8).

A. Upregulated genes



Accession number (UniGene NCBI)	Gene	Stimulation	Description/main functions
Transcription factors			
<i>mesenchymal</i>			
Mm.1347	Hlx1	2.3	homeobox gene, cell interactions
Mm.4509	Runx2	2.2	metalloprotease induction, anti-proliferative
Mm.103615	Heyl	2.4	bHLH factor, muscle expression, differentiation,
<i>epithelial and mesenchymal</i>			
Mm.2334	Smad2	2.1	TGFβ pathway, α smooth muscle actin regulator
Mm.4325	Klf4	2.3	epithelial and muscle differentiation
Mm.3102	Tal1	2.3	bHLH factor, inhibition of muscle differentiation
Adhesion molecules			
Mm.4427	α _v integrin	2.2	fibronectin/vitronectin receptor
Mm.4967	α _M integrin	2.0	ICAM receptor
Mm.21117	β4 integrin	2.2	laminin-111, -332, -511 receptor
Mm.4071	67kD receptor	3.4	laminin-111 receptor
Wnt signaling			
Mm.36416	Fzd2	2.0	Wnt receptor
Mm.3400	Dvl1	2.0	member of Wnt pathway
Mm.19155	Sfrp2	2.0	soluble Wnt antagonist
Mm.1385	Pitx2	2.1	transcription factor, Wnt pathway target
Mm.870	Msx1	3.1	homeobox gene, Wnt target
Mm.1526	Myod1	2.2	myogenic factor, Wnt target
PI3K/Akt signaling			
Mm.20884	Rasgrp2	2.0	regulator of Ras signaling
Mm.153755	Pik3cd	2.0	catalytic domain of PI3Kinase, activator of Akt
Mm.10301	Pik3c2g	2.0	PI3kinase isoform, activator of Akt

B. Downregulated genes



Accession number (UniGene NCBI)	Gene	Repression	Description/main functions
Transcription factors			
Mm.4697	Stat5	2.3	activator of transcription
Mm.5	Hoxa10	2.0	mesenchymal homeobox gene (hindgut)
Mm.39487	Sall2	2.3	mesenchymal homeobox gene
Epithelial differentiation			
Mm.22126	Fabp1	4.4	fatty acid binding protein
Mm.1891166	Apolipoprotein1	3.0	cholesterol transport
Mm.1151	DPP4	3.2	digestive enzyme, serine exopeptidase
Mm.5346	Meprin	2.0	metalloendopeptidase
Muscle differentiation			
Mm.6712	Desmin	2.2	muscle intermediate filament
Mm.3126	FHL1	2.6	protein-protein interactions (LIM domain)
Motility control			
Mm.154796	NeuropeptideY	8.0	neuro-modulator peptide
Mm.3521	CCKA receptor	2.0	peptide hormone, muscle contraction
Wnt signaling			
Mm.4709	Wnt10b	2.1	Wnt isoform
Mm.5114	Dvl2	2.8	member of Wnt pathway
Mm.23684	Axin1	2.0	regulation of β-catenin stability
PI3K/Akt signaling			
Mm.177194	Akt2	4.4	cell growth, proliferation, survival

Figure 2: Pie chart of the 192 upregulated genes (A) and the 164 downregulated genes (B) grouped according to their functional role.

On the right examples of upregulated and downregulated genes in intestines of laminin α5^{-/-} mutant mice are displayed and classified according to some families. Brief description/ and main functions of the genes are given as well as the rate of stimulation or repression.

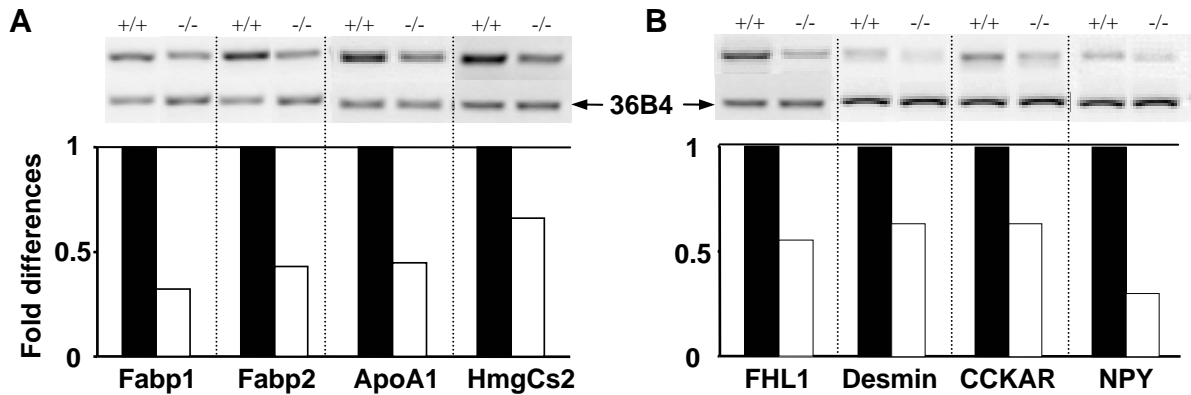


Figure 3: Validation of candidate gene expression.

Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed for selected genes belonging to the epithelial (A) or muscle (B) differentiation family. RT-PCR (representative gels are shown) was performed (at least 3 repeats per gene) on cDNA prepared from RNA isolated from E15.5 control (+/+) or E15.5 knock-out (-/-) intestines with reproducible results. Below: Data are represented as fold differences between knock-out (white bars) versus control (black bars) levels (with the control normalized to 1 owing to the internal control 36B4 ribosomal gene). The expression pattern observed for these genes are very comparable to the microarray profile, supporting a high degree of confidence to the microarray profile.

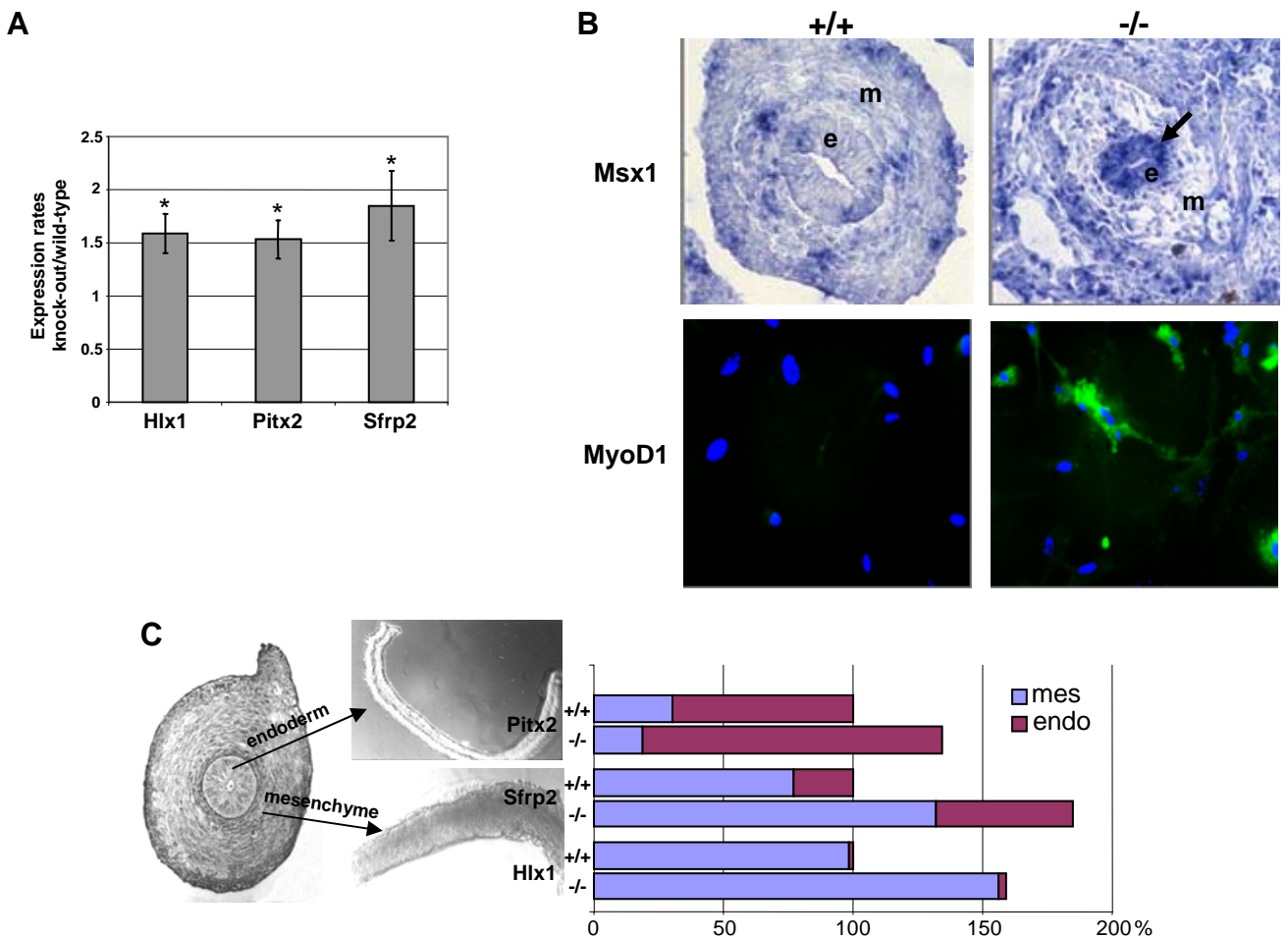


Figure 4: Expression of Wnt-signaling pathway family genes in laminin a5^{-/-} intestines.

(A) Quantitative RT-PCR analysis of some genes belonging to the Wnt signaling pathway or of potential target genes. Total RNA isolated from E15.5 knock-out intestines and from E15.5 control intestines were used for RT-PCR. Data represented as diagrams show that the gene expression rates are statistically significant higher in knock-out versus control wild-type intestines (mean \pm SEM, $n=7$ to $n=9$) (* $p < 0.02$). (B) *In situ* hybridization of *Msx1* on control (+/+) and laminin a5 mutant intestines (-/-) and immunostaining of *MyoD1* (green) on cultured mesenchymal cells derived from E 14.5 control (+/+) and knock-out (-/-) intestines. Note the stimulation of *Msx1* and induction of *MyoD1* in mutant endodermal (arrow) and mesenchymal cells respectively; e: endoderm; m: mesenchyme (C) E 13.5 intestines were collected and endoderm was separated from mesenchyme using collagenase. Quantitative RT-PCR experiments were performed on isolated compartments for the three genes depicted in (A) namely *Pitx2*, *Sfrp2* and *Hlx1*. Diagrams show the relative expression of genes between mesenchyme (mes) and endoderm (endo) with 100% being the total amount in control intestines: *Pitx2* is mostly an endodermal product while *Sfrp2* and *Hlx1* are mainly expressed by the mesenchyme. The relative proportion of the genes between the mesenchymal and endodermal compartment are not modified in laminin a5^{-/-} intestines.

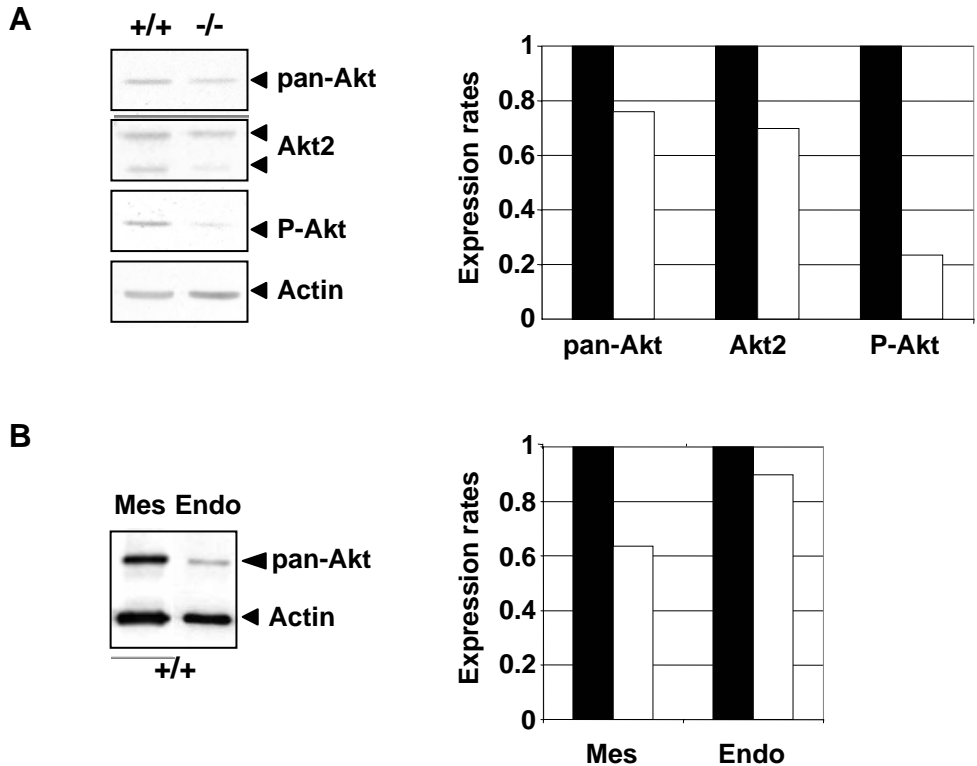


Figure 5: Expression of Akt and of its active form is decreased in laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines.

(A) Representative immunoblot showing the expression of Akt (pan-Akt), Akt2 and Phospho-Akt (P-Akt) in E 15.5 control (+/+) and mutant (-/-) intestines. On the right are graphs, displaying the averages of two experiments, with quantitative data expressed as rates between knock-out (white bars) versus control (black bars) levels (with the control normalized to 1 owing to the internal control actin). (B) Representative immunoblot showing that Akt is mainly expressed in the E 13.5 intestinal mesenchyme (Mes) as compared to endoderm (Endo). Graphs on the right show that the decrease in Akt expression in laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines (white columns) is mainly due to a loss in the mesenchyme.

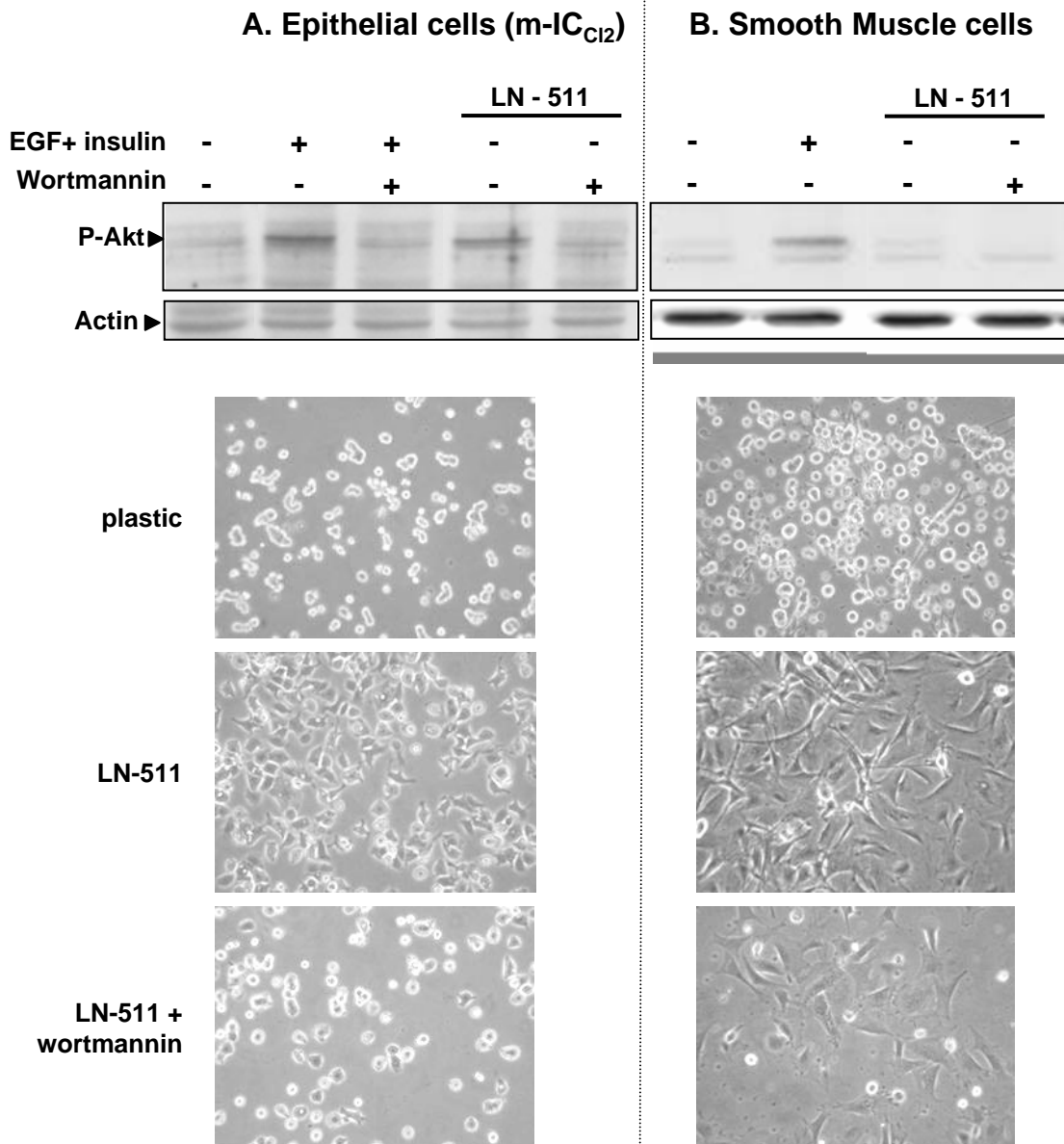


Figure 6: Activation of Akt in epithelial cells adhering to laminin-511.

Serum-starved murine m-IC_{C12} epithelial cells (A) and muscle (B) cells were detached and maintained in suspension with 1% BSA for 90 min and then replated on uncoated dishes with or without EGF and insulin or on dishes coated with laminin-511 for 150mn. The PI3K inhibitor wortmannin (1.5 μ M) was added where indicated. Cell lysates were analyzed for phosphorylated Akt (P-Akt) and actin after blotting. In parallel, cells were photographed by phase-contrast microscopy on plastic dishes, on laminin-511 matrix (LN-511) and on laminin-511 in the presence of wortmannin. Activation of Akt is visible in epithelial cells cultured on laminin-511 but not in muscle cells.

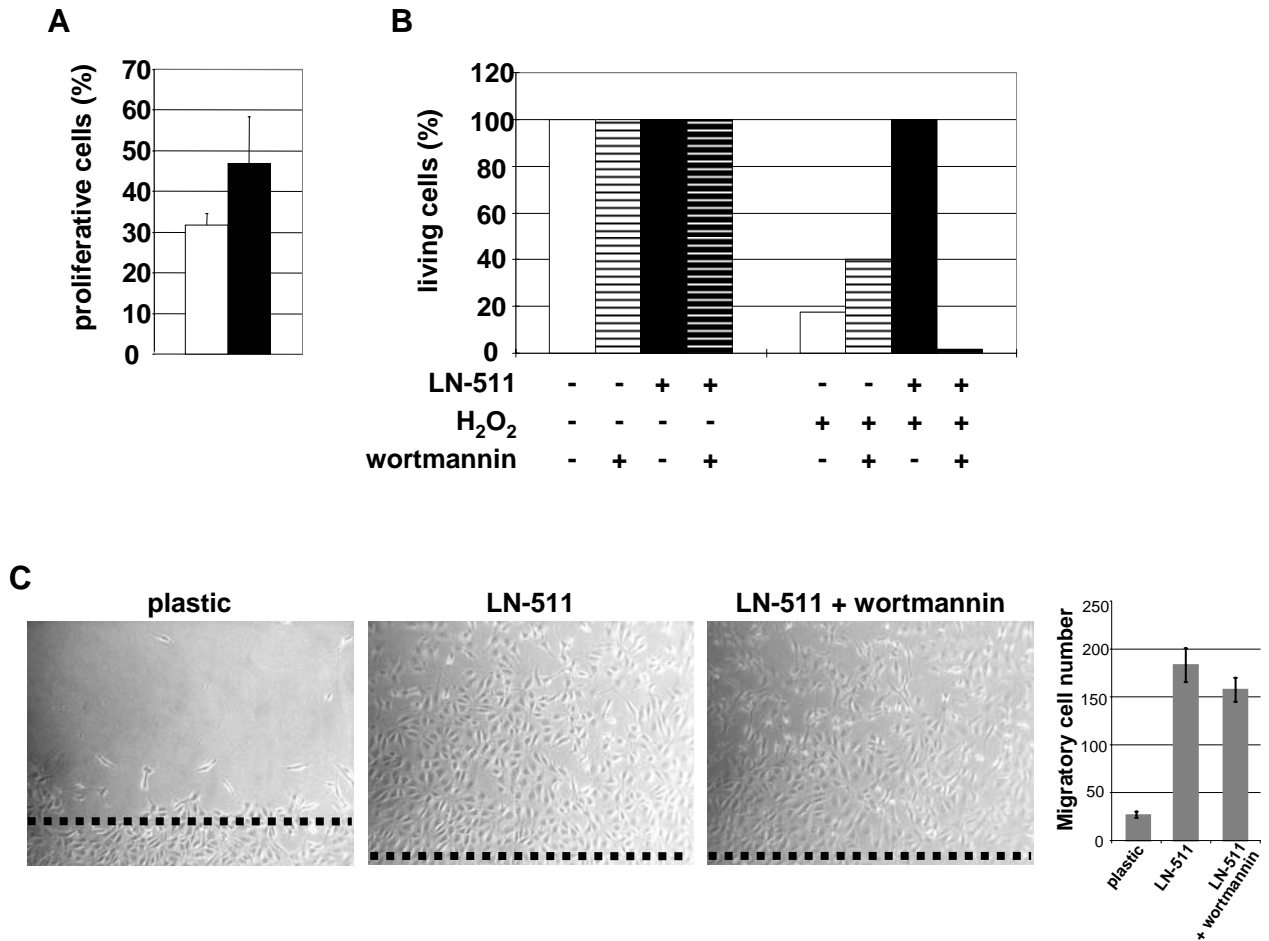


Figure 7: Laminin-511 controls epithelial cell proliferation, survival and migration.

(A) For proliferation assay, mouse m-ICC12 intestinal cells were seeded on dishes coated (black bar) or not (empty bar) with laminin-511 and allowed to attach for 24h. Quantification of the proliferative cells was performed using BrDU staining and reported as a percentage of total cells present on the dishes visualized by DAPI nuclear staining. Data are derived from 3 independent experiments (each performed 4 to 6 times) and are presented as means with SEM. (B) For survival assay, mouse m-ICC12 intestinal cells were seeded on laminin-511 or on uncoated dishes; after 6h cells in presence or not of wortmannin cells were incubated with 200µM H₂O₂ in serum-deprived culture medium. Quantification of cells was performed using MTS. The data are presented as the percentage of recovered cells in the absence of H₂O₂. A representative experiment is shown out of 4 that were done. Data show the anti-apoptotic effect of laminin-511 which is clearly dependent on PI3Kinase as assessed by the absence of living cells on laminin-511 with the inhibitor wortmannin. (C) Migration of m-ICC12 cells on plastic, laminin-511, and on laminin-511 with wortmannin was followed by phase contrast-microscopy and counted. Data (mean +/- SEM) represented on the graph show that laminin-511 stimulated cell migration independently of PI3-Kinase/Akt pathway

References

- Aumailley, M. et al. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*. 24, 326-332.
- Basson, M. D., Turowski, G., and Emenaker, N. J. (1996). Regulation of human (Caco-2) intestinal epithelial cell differentiation by extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* 225, 301-305.
- Bates, M. D., Dunagan, D. T., Welch, L. C., Kaul, A., and Harvey, R. P. (2006). The Hlx homeobox transcription factor is required early in enteric nervous system development. *BMC Dev. Biol.* 6, 33.
- Beaulieu, J. F., and Vachon, P. H. (1994). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology*. 106, 829-839.
- Beck, F., Tata, F., and Chawengsaksophak, K. (2000). Homeobox genes and gut development. *Bioessays*. 22, 431-441.
- Benhamouche, S. et al. (2006). Apc Tumor Suppressor Gene Is the "Zonation-Keeper" of Mouse Liver. *Developmental Cell*. 10, 759-770.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J. P., Kahn, A., Pringault, E., and Vandewalle, A. (1996). Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am. J. Physiol. -Cell Physiol.* 39, C1666-C1674.
- Bolcato-Bellemin, A. L., Lefebvre, O., Arnold, C., Sorokin, L., Miner, J. H., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2003). Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev. Biol.* 260, 376-390.
- Brown, S., McGrath, M. J., Ooms, L. M., Gurung, R., Maimone, M. M., and Mitchell, C. A. (1999). Characterization of Two Isoforms of the Skeletal Muscle LIM Protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J. Biol. Chem.* 274, 27083-27091.
- Chia, J., Kusuma, N., Anderson, R., Parker, B., Bidwell, B., Zamurs, L., Nice, E., and Pouliot, N. (2007). Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am J Pathol.* 170, 2135-2148.
- Coles, E. G., Gammill, L. S., Miner, J. H., and Bronner-Fraser, M. (2006). Abnormalities in neural crest cell migration in laminin [alpha]5 mutant mice. *Dev. Biol.* 289, 218-228.
- Cognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218, 213-234.
- Cossu, G., and Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18, 6867-6872.
- Dagle, J. M., Sabel, J. L., Littig, J. L., Sutherland, L. B., Kolker, S. J., and Weeks, D. L. (2003). Pitx2c attenuation results in cardiac defects and abnormalities of intestinal orientation in developing *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 262, 268-281.
- De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. (2000). Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.* 16, 389-395.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G. R., and Roberts, D. J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1322-1332.

- Doi, M. et al. (2002). Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 12741-12748.
- Durbeej, M., Henry, M. D., and Campbell, K. P. (1998). Dystroglycan in development and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 594-601.
- Faraldo, M. M., Deugnier, M. A., Thiery, J. P., and Glukhova, M. A. (2001). Growth defects induced by perturbation of beta1-integrin function in the mammary gland epithelium result from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways. *EMBO Rep.* *2*, 431-437.
- Freund, J. N., Domon-Dell, C., Kedinger, M., and Duluc, I. (1998). The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem. Cell Biol.* *76*, 957-969.
- Fukumoto, S., Miner, J. H., Ida, H., Fukumoto, E., Yuasa, K., Miyazaki, H., Hoffman, M. P., and Yamada, Y. (2006). Laminin {alpha}5 Is Required for Dental Epithelium Growth and Polarity and the Development of Tooth Bud and Shape. *J. Biol. Chem.* *281*, 5008-5016.
- Gerhart, J., Bast, B., Neely, C., Iem, S., Amegbe, P., Niewenhuis, R., Miklasz, S., Cheng, P. F., and George-Weinstein, M. (2001). MyoD-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *155*, 381-392.
- Ghosh, S., and Stack, M. S. (2000). Proteolytic modification of laminins: functional consequences. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 238-246.
- Giles, R.H., van Es J.H., and Clevers H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1653*:1-24
- Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* *180*, 227-241.
- Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* *19*, 877-890.
- Gu, J., Fujibayashi, A., Yamada, K. M., Sekiguchi, K. (2002a). Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK/ERK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* *277*, 19922-19928
- Gu, J., Nishiuchi R., and Sekiguchi K. (2002b). Matrix metalloproteinase-2 is involved in A549 cell migration on laminin-10/11. *Biochem. Biophys Res Commun.* *296*:73-77
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L. M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* *85*, 979-1000.
- Hentsch, B., Lyons, I., Li, R. L., Hartley, L., Lints, T. J., Adams, J. M., and Harvey, R. P. (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Gene Develop.* *10*, 70-79.
- Hjalt, T. A., Semina, E. V., Amendt, B. A., and Murray, J. C. (2000). The Pitx2 protein in mouse development. *Dev. Dyn.* *218*, 195-200.
- Iyer, V. R. et al. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science.* *283*, 83-87.
- Jones, S. E., and Jomary, C. (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays.* *24*, 811-820.

- Kapoor, A., Li, H. J., and Leiter, A. B. (2007). Intestinal development: the many faces of Wnt signaling. *Gastroenterology*. *133*, 710-712.
- Katz, E., and Streuli, C. H. (2007). The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. *39*, 715-726.
- Kedinger, M., Duluc, I., Fritsch, C., Lorentz, O., Plateroti, M., and Freund, J. N. (1998). Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *859*, 1-17.
- Kedinger, M., Freund, J. N., Launay, J. F., and Simon-Assmann, P. (2000). Cell interactions through the basement membrane in intestinal development and differentiation. In: *Development of the Gastrointestinal Tract*, eds. I.R.Sanderson and W.A.Walker, London: B.C.Decker Inc., 83-102.
- Kim, B. M., Buchner, G., Miletich, I., Sharpe, P. T., and Shivdasi, R. A. (2005). The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Developmental Cell*. *8*, 611-622
- Kim, B. M., Mao, J., Taketo, M. M., and Shivdasani, R. A. (2007). Phases of canonical Wnt signaling during the development of mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology*. *133*, 529-538.
- Kim, S. K., and MacDonald, R. J. (2002). Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*. *12*, 540-547.
- Kioussi, C. et al. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/[beta]-Catenin --> Pitx2 Pathway Mediating Cell-Type-Specific Proliferation during Development. *Cell*. *111*, 673-685.
- Klaffky, E., Williams, R., Yao, C. C., Ziober, B., Kramer, R., and Sutherland, A. (2001). Trophoblast-specific expression and function of the integrin alpha 7 subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev. Biol.* *239*, 161-175.
- Lefebvre, O., Sorokin, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1999). Developmental expression and cellular origin of the laminin $\alpha 2$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains in the intestine. *Dev. Biol.* *210*, 135-150.
- Levin, J. M., El Andaloussi, R. A., Dainat, J., Reyne, Y., and Bacou, F. (2001). SFRP2 expression in rabbit myogenic progenitor cells and in adult skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *22*, 361-369.
- Li, J. et al. (2003). Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J.* *22*, 2400-2410.
- Lickert, H., Kispert, A., Kutsch, S., and Kemler, R. (2001). Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mechanisms of Development*. *105*, 181-184.
- Marinkovich, M. P. (2007). Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer*. *7*, 370-380.
- Miner, J. H., Cunningham, J., and Sanes, J. R. (1998). Roles for laminin in embryogenesis: Exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha 5 chain. *J. Cell Biol.* *143*, 1713-1723.
- Miner, J. H., and Li, C. (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* *217*, 278-289.
- Miner, J. H., and Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 255-284.
- Nguyen, N. M., Miner, J. H., Pierce, R. A., and Senior, R. M. (2002). Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Dev. Biol.* *246*, 231-244.

- Olsen, J., Lefebvre, O., Fritsch, C., Troelsen, J. T., Orian-Rousseau, V., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2000). Involvement of activator protein 1 complexes in the epithelium-specific activation of the laminin γ 2-chain gene promoter by hepatocyte growth factor (scatter factor). *Biochem J.* 347, 407-417.
- Park, Y. K. et al. (2005). Gene expression profile analysis of mouse colon embryonic development. *Genesis.* 41, 1-12.
- Parsons, S. F. et al. (2001). Lutheran blood group glycoprotein and its newly characterized mouse homologue specifically bind α 5 chain-containing human laminin with high affinity. *Blood.* 97, 312-320.
- Perou, C. M. et al. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9212-9217.
- Pouliot, N., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2001). Laminin-10 mediates basal and EGF-stimulated motility of human colon carcinoma cells via α (3) β (1) and α (6) β (4) integrins. *Exp. Cell Res.* 266, 1-10.
- Pouliot, N., Saunders, N. A., and Kaur, P. (2002). Laminin 10/11: an alternative adhesive ligand for epidermal keratinocytes with a functional role in promoting proliferation and migration. *Exp. Dermatol.* 11, 387-397.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev Biol.* 20, 695-723.
- Sansom, O. J. et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 18, 1385-1390.
- Sgambato, A., and Brancaccio, A. (2005). The dystroglycan complex: from biology to cancer. *J. Cell Physiol.* 205, 163-169.
- Siler, U., Seiffert, M., Puch, S., Richards, A., Torok-Storb, B., Muller, C. A., Sorokin, L., and Klein, G. (2000). Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood.* 96, 4194-4203.
- Simon-Assmann, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Turck, N., Piccinni, S., Olsen, J., Launay, J. F., Lefebvre, O., and Kedinger, M. (2003). Basement membrane laminins in normal and pathological intestine. In: *Disease Progression and Carcinogenesis in the Gastrointestinal Tract*, ed. P. Johnstone, London: Kluwer Academic Publishers, 223-239.
- Simon-Assmann, P., Duclos, B., Orian-Rousseau, V., Arnold, C., Mathelin, C., Engvall, E., and Kedinger, M. (1994). Differential expression of laminin isoforms and α 6- β 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev. Dyn.* 201, 71-85.
- Simon-Assmann, P., and Kedinger, M. (1994). Embryonic Gut-Disaggregated culture. Co-culture of embryonic epithelial cells and fibroblastic cells. In: *Cell and Tissue Laboratory Procedures*, eds. J. Griffiths, Doyle A, and Newell DG, 3.1-3.6.
- Simon-Assmann, P., and Kedinger, M. (2000). Tissues recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. In: *Methods in Molecular Biology*, eds. C. Streuli and M. Grant, Totowa, NJ: Humana Press Inc., 311-319.
- Simon-Assmann, P., Lefebvre, O., Bellissent-Waydelich, A., Olsen, J., Orian-Rousseau, V., and De Arcangelis, A. (1998). The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. In: *Intestinal Plasticity in Health and Disease*, eds. B. Wiedenmann, S. Rosewicz, M. Zeitz, and E. O. Riecken, New York: 46-64.

- Stegmann, A. et al. (2006). Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol. Genomics*. 27, 141-155.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., and Cossu, G. (1998). Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development*. 125, 4155-4162.
- Teller, I. C., and Beaulieu, J. F. (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* 3, 1-18.
- Tseng, G. C., Oh, M. K., Rohlin, L., Liao, J. C., and Wong, W. H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* 29, 2549-2557.
- Turck, N., Gross, I., Gendry, P., Stutzmann, J., Freund, J. N., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J. F. (2005). Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 303, 494-503.
- Turck, N., Lefebvre, O., Gross, I., Gendry, P., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Launay, J. F. (2006). Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J. Cell Physiol.* 206, 545-555.
- Willert, J., Epping, M., Pollack, J., Brown, P. O., and Nusse, R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Developmental Biology*. 2, 8.
- Yang, Z. Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., and Hemmings, B. A. (2003). Protein Kinase B α /Akt1 Regulates Placental Development and Fetal Growth. *J. Biol. Chem.* 278, 32124-32131.
- Yasugi, S., and Mizuno, T. (1996). Mesenchymal influences as microenvironmental factors regulating morphogenesis and cytodifferentiation of gut epithelial cells. In: Embryos, endocrine cells and the neural crest, eds. B.Kramer and B.Rawdon, South Africa: Witwatersrand University Press, 99-113.
- .
- .

Acknowledgements

L. Ritié is a recipient of fellowships from the French Ministry of Research and Education and the Association pour La Recherche sur le Cancer. We thank Dr A. Vandewalle (INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, Paris, France) for providing the m-IC_{Cl2} cells. We thank A. Klein and C. Arnold for their expert technical assistance for cell culture and tissue dissociation. L. Eleuterio is greatly thanked for her help in the finalization of the manuscript , and M and P Lavogez for animal care.

Résultats complémentaires

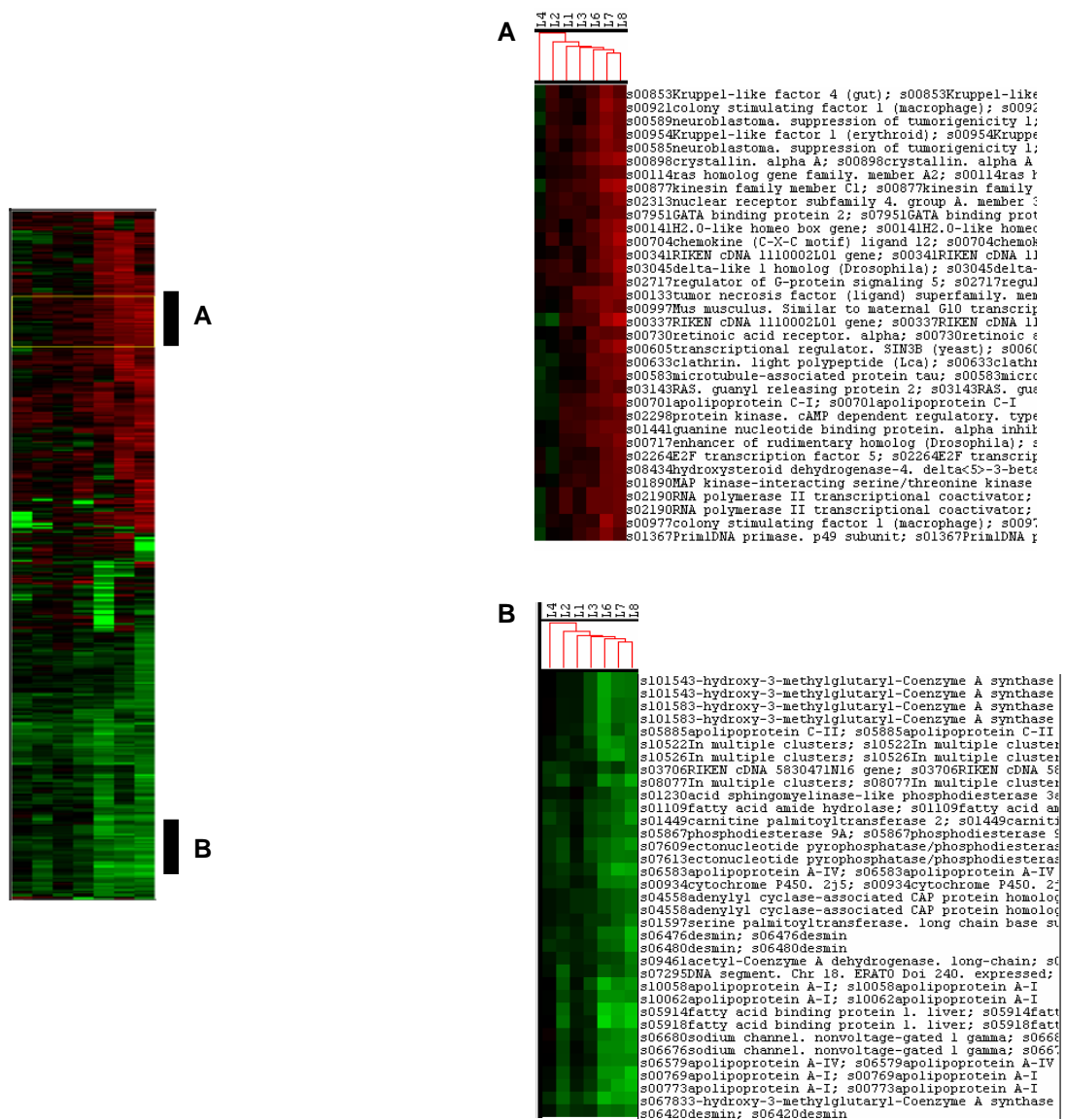


Figure 48: « Clustering » de 478 gènes (dont répliqués) différentiellement exprimés de plus de 2 fois dans les intestins laminine $\alpha 5^{-/-}$

Chaque colonne représente une expérience, et chaque ligne représente un gène. Les carreaux rouges représentent un taux d'expression de l'échantillon au moins 2 fois supérieur à celui de la référence, les carreaux verts un taux au moins 2 fois inférieur et les carreaux noirs représentent les gènes ayant un taux d'expression similaire à la référence. (A) Agrandissement d'un regroupement de gènes sur-exprimés dans les intestins $\alpha 5^{-/-}$ (B) Agrandissement d'un regroupement de gènes sous-exprimés dans les intestins $\alpha 5^{-/-}$. (L1-L4): échantillons $\alpha 5^{+/+}$; (L6-L7): échantillons $\alpha 5^{-/-}$

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4	Résultat global
Nombre total de gènes	2150	2150	2150	2150	2150
Degré de différence d'expression	2	2	2	2	2
Nombre de gènes sur-exprimés	88	73	112	116	192
Nombre de gènes sous-exprimés	206	102	15	102	164

Tableau III : Gènes différentiellement exprimés de plus de deux fois dans les intestins $\alpha 5^{-/-}$

Les données sont montrées pour chaque répliquat biologique. La colonne des résultats indique le nombre de gènes différentiellement exprimés dans au moins 2 des 4 expériences.

V. Résultats complémentaires

A. Analyse transcriptomique : « Clustering » des gènes sortis lors de la première étape de sélection

Après filtrage des données correspondant aux faibles intensités, une première étape de sélection a été réalisée et a permis de sélectionner des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons Lama5^{+/+} et Lama5^{-/-} selon les critères suivants : (i) différence d'expression de plus de 2 fois, (ii) différence observée dans au moins 2 échantillons Lama^{-/-}. L'utilisation d'une référence commune a permis de générer des données inter-comparables parmi les différents échantillons et de réaliser un « clustering » (figure 48). Suite à un problème expérimental, l'échantillon L5 présente des intensités très faibles et donc de nombreux ratios faussés. Cet échantillon L5 n'a donc pas été pris en compte pour le filtrage et le « clustering » de cette première étape de sélection. Le « clustering » révèle un **regroupement des échantillons $\alpha 5$ ^{+/+}** (L1 à L4) entre eux et un **regroupement des échantillons $\alpha 5$ ^{-/-}** (L6 à L8). Les réplicats biologiques $\alpha 5$ ^{-/-} présentent donc des profils d'expression géniques similaires reflétant une homogénéité génique entre les différentes portées. Comme attendu, les échantillons $\alpha 5$ ^{+/+} présentent très peu de variations d'expression génique par rapport à la référence (carreaux majoritairement noirs). Le « clustering » révèle un groupe de gènes sur-exprimés et un groupe de gènes sous-exprimés dans les intestins mutants.

La comparaison des 4 réplicats biologiques a permis de détecter **192 gènes sur-exprimés** de plus de 2 fois dans les intestins de souris mutantes pour la chaîne $\alpha 5$. **164 gènes ont été trouvés réprimés** de plus de 2 fois dans les intestins $\alpha 5$ ^{-/-} (tableau III). La liste complète de ces gènes est consultable en Annexe 1 et Annexe 2.

B. Relation laminine-511 – voie Wnt

Nous venons de voir dans la publication 1 que plusieurs gènes de la voie Wnt ont été trouvés dérégulés dans les intestins Lama5^{-/-}. En effet, Wnt10b, Dvl2 ont été trouvés sous-exprimés dans les intestins $\alpha 5$ ^{-/-} et Sfrp2, inhibiteur soluble de Wnt, surexprimé, ce qui montre une certaine cohérence, alors que le récepteur Frizzled 2, Dvl1 et plusieurs gènes cibles ont été trouvés sur-exprimés, ce qui va dans le sens inverse des premières observations. Afin d'éclaircir le sens de régulation de la voie Wnt par la chaîne $\alpha 5$, nous avons analysé l'effet de la laminine-511 sur la voie Wnt *in vitro* dans des cellules intestinales transfectées avec le système TOPFLASH, rapporteur de l'activation de la voie.

1. Etude de la régulation de la voie Wnt par la laminine-511 *in vitro* dans les cellules intestinales

Les cellules m-IC_{cl2} et les cellules HEK 293 ont été transfectées avec les différents plasmides du système TOPFLASH, 24 heures après ensemencement. Les cellules ont alors été réensemencées sur plastique ou sur une matrice riche en laminine-511. Après un délai variable suivant l'expérience (de 6 heures à 24 heures), les cellules sont lysées puis le niveau de luminescence est mesuré au luminomètre après ajout des substrats pour la luciférase firefly puis pour la luciférase renilla. Les principaux résultats sont présentés sous forme d'histogrammes représentant le rapport de l'activité luciférase firefly sur celui de la luciférase renilla (figure 49) en fonction des plasmides transfectés.

Le système TOPFLASH n'ayant jamais été utilisé dans les cellules m-IC_{cl2}, j'ai tout d'abord vérifié le bon fonctionnement du système dans ces cellules par comparaison avec les cellules HEK 293 dans lesquelles le système d'activation est fonctionnel. Les résultats obtenus dans les cellules intestinales sont parallèles à ceux obtenus dans les cellules HEK 293 (voir figure 49A). En effet il existe une augmentation du ratio de la luminescence firefly sur renilla après

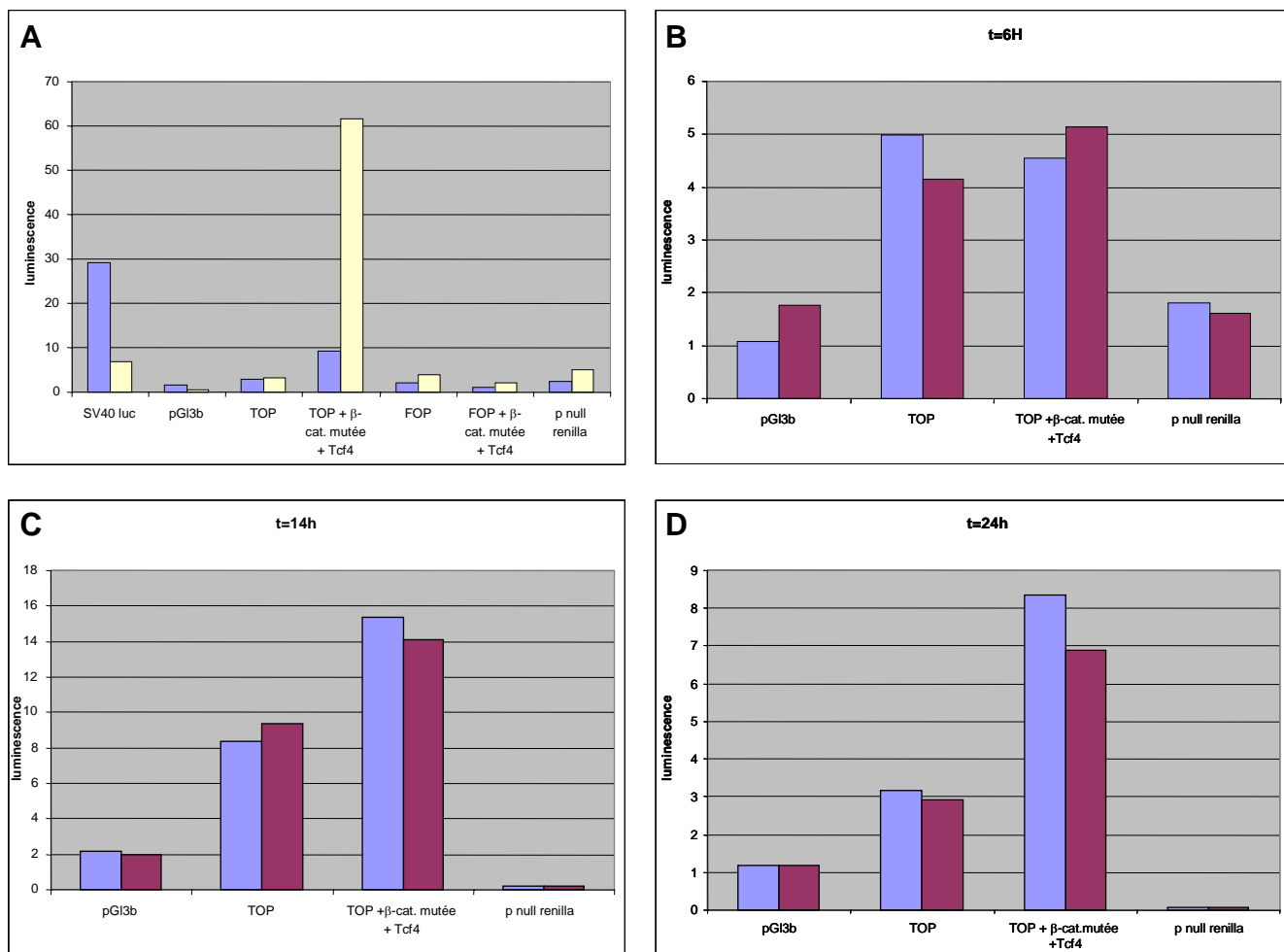


Figure 49 : Transfection des cellules HEK 293 et m-IC₁₂ par le système TOPFLASH

Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme représentant le ratio de la luminescence firefly sur la luminescence renilla en fonction des divers plasmides transfectés.

(A) Histogramme montrant la validation du système TOPFLASH dans les cellules mIC₁₂ (bleu) et HEK 293 (jaune)

(B-D) Histogrammes représentatifs relatifs aux cellules mIC₁₂ ensemencées sur plastique (bleu) ou sur laminine-511 (rouge) pendant 6 h (B), 14 h (C) ou 24 h (D).

transfection avec le plasmide TOP d'un facteur 3 par rapport aux cellules transfectées par pGI3b. Par contre ce niveau d'activation est comparable à celui trouvé dans les cellules transfectées avec le plasmide FOP comprenant des éléments de réponse à la β -caténine mutés et donc non répondeurs. Les cellules m-IC_{cl2} et HEK 293 ne présentent donc pas d'activation basale de la voie Wnt et ne semblent donc pas sécréter ce facteur. Une augmentation du ratio est induite par l'ajout des plasmides β -caténine mutée et Tcf4, quoique nettement plus faible dans les cellules intestinales par rapport aux cellules HEK 293. Cette augmentation du ratio est bien spécifique des éléments de réponse de la voie Wnt puisqu'elle n'existe pas dans les cellules transfectées par le plasmide FOP. L'état d'activation de la voie Wnt est donc mesurable dans les cellules intestinales utilisées. Pour voir si la laminine-511 a un effet modulateur de la voie Wnt, j'ai ensuite comparé l'activité luciférase des cellules mises sur ce substrat à celle de cellules ensemencées sur plastique après différents temps de culture (6h, 14h, 24h) (figure 49 B-D).

Quelque soit le temps de culture, l'adjonction de laminine-511 en tant que substrat ne modifie pas statistiquement le taux d'activité luciférase. L'adjonction des plasmides β -caténine mutée et Tcf4 permet d'augmenter l'activité luciférase à 14 h et 24 h (de 2 et 4 fois respectivement). Quand les cellules sont ensemencées sur laminine-511, une légère diminution de l'activité luciférase est visible après 6h, quoique faible, et cette légère répression s'efface ensuite.

La laminine-511 n'a donc pas d'effet sur l'activation de la voie Wnt, du moins dans les cellules épithéliales. Elle n'est ni capable d'activer directement cette voie ni d'augmenter la sécrétion de facteur Wnt par les cellules épithéliales. La laminine-511 a peut-être une action répressive sur la voie Wnt dans ce compartiment cellulaire mais très mineure. Il n'est cependant pas exclu que la laminine-511 module la voie Wnt dans le compartiment musculaire de l'intestin ou dans la lamina propria ou que cette modulation existe seulement dans le contexte du développement embryonnaire.

J'ai tenté de réaliser des expériences similaires sur les cellules mésenchymateuses et les cellules musculaires lisses intestinales. Malheureusement je n'ai pas réussi à obtenir une transfection efficace de ces cellules ni avec le jet PEI, ni avec la lipofectamine.

2. Analyse de l'expression de Wnt10b et Fzd2 dans les bourgeons dentaires de souris Lama5-/-

Compte tenu de la relativement faible expression de Wnt10b dans l'intestin embryonnaire, nous n'avons pas pu confirmer par RT-QPCR la sous-expression de ce facteur révélée par le « microarray ». Au vu de l'importance de ce gène dans le développement dentaire (Dassule et al., 1998; Nadiri et al., 2004), nous avons, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Lesot (INSERM U 595 - Strasbourg), analyser l'expression de Wnt10b et Fzd2 dans les bourgeons dentaires sauvages et invalidés pour la chaîne $\alpha 5$, par immunofluorescence. Comme il avait été précédemment décrit, nous avons observé une altération de la morphogenèse des bourgeons dentaires chez les souris Lama5^{-/-}. Les bourgeons sont en effet de taille réduite et présentent des lèvres et un pédoncule plus étroits. A E15,5, les bourgeons dentaires sauvages présentent une forte expression de Wnt10b, à la fois membranaire et cytoplasmique, au niveau de l'épithélium oral et de l'épithélium dentaire externe. Cette expression est asymétrique, étant plus intense du côté buccal que du côté lingual. Wnt10b n'est en revanche pas exprimé dans le mésenchyme dentaire ou péri-dentaire. Les bourgeons dentaires des souris Lama5^{-/-} présentent une baisse de l'expression globale de Wnt10b, et une perte du marquage cytoplasmique au niveau du pédoncule de l'épithélium dentaire externe et également au niveau du réticulum stellaire. Par contre, une sur-expression de Wnt10b est trouvée au niveau du nœud de l'émail (« enamel knot ») alors que les bourgeons contrôles ne présentent pas d'expression à ce niveau (figure 50). Des modifications similaires sont retrouvées au niveau de l'expression du récepteur Fzd2. Alors que les bourgeons sauvages montrent une expression de Fzd2 soit membranaire, soit sous forme d'agrégats, les bourgeons Lama5^{-/-} présentent une expression diminuée au niveau du pédoncule

de l'épithélium dentaire externe et du réticulum stellaire et en revanche augmentée au niveau du nœud de l'émail et des lèvres.

La sur-expression de Fzd2 révélée par le « microarray » dans l'intestin en développement n'a pas pu être vérifiée dans le tissu dentaire. Par contre, l'absence de chaîne $\alpha 5$ semble bien induire une sous-expression de Wnt10b dans le bourgeon dentaire au niveau des zones où le facteur est normalement bien exprimé, et également une expression ectopique au niveau du nœud de l'émail où une prolifération anormale avait justement été décrite dans les bourgeons Lama5^{-/-} (Fukumoto et al., 2005).

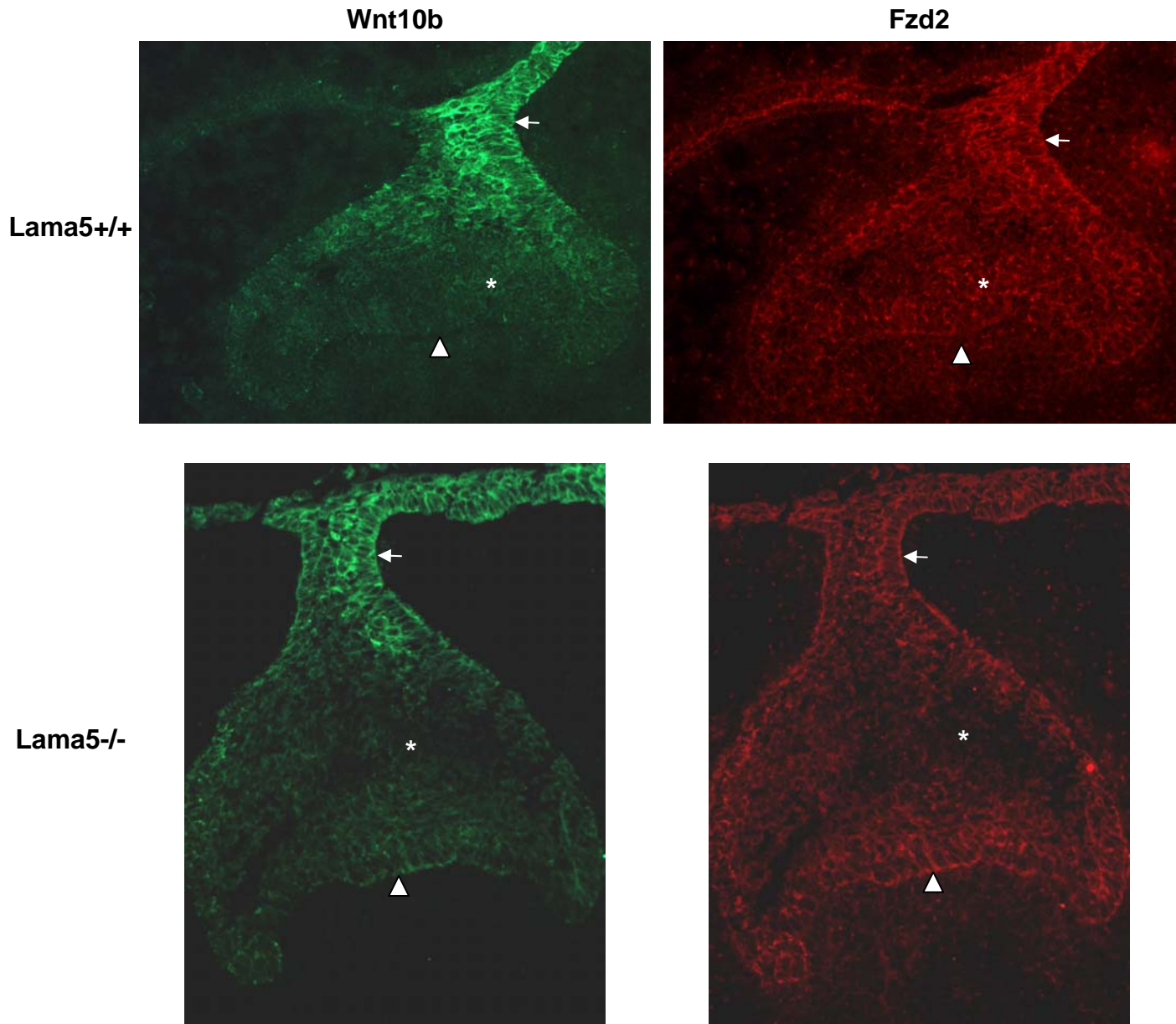


Figure 50 : Analyse par immunofluorescence de l'expression de Wnt10b (vert) et de Fzd2 (rouge) dans les bourgeons dentaires sauvages et invalidés pour la chaîne $\alpha 5$.

Les flèches blanches montrent le pédoncule de l'épithélium dentaire externe.

L'astérisque indique le réticulum stellaire.

La pointe de flèche montre le nœud de l'émail.

C. Relation laminine-511 – voie Akt

1. Analyse de l'expression et de l'activation d'Akt *in vivo* dans les deux compartiments tissulaires de l'intestin embryonnaire

Nous avons vu précédemment que le mésenchyme d'intestin embryonnaire sauvage à E13,5 exprime 3 fois plus Akt que l'endoderme et que la chute d'expression dans les intestins invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ est principalement attribuée au mésenchyme (publication 1, figure 5B). Les résultats présentés dans la publication comparant les taux d'expression d'Akt dans les mésenchymes et endodermes intestinaux Lama5^{+/+} et Lama5^{-/-} ont été quantifiés à partir des Western Blot présentés ci-dessous (figure 51 A et B). De plus, j'ai analysé l'activation d'Akt dans les 2 compartiments de l'intestin en développement. Il s'avère que le **mésenchyme** présente également la forme **activée** d'Akt alors qu'aucune activation n'a pu être détectée dans le compartiment endodermique (Figure 51 C).

Ainsi, dans l'**intestin embryonnaire**, la régulation de la voie Akt par la chaîne $\alpha 5$ de laminine, tant au niveau de son **expression** que de son **activation**, semble être attribuée au compartiment mésenchymateux.

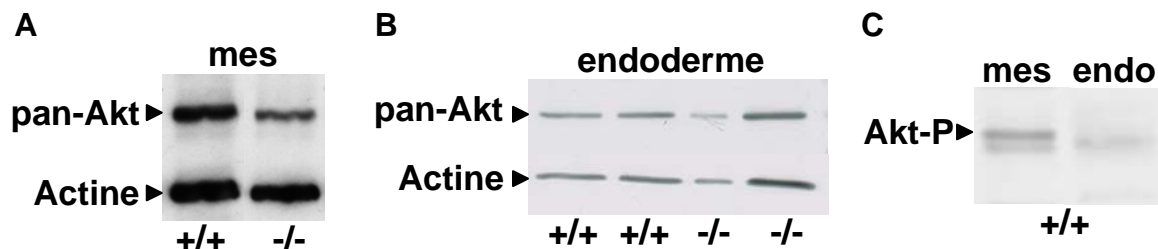


Figure 51 : Western Blots représentant l'expression et l'activation d'Akt dans les compartiments endodermique et mésenchymateux de l'intestin embryonnaire E13,5 Lama5^{+/+} et Lama5^{-/-}.

- (A) Expression d'Akt dans le mésenchyme des souris sauvages ou invalidées pour la chaîne $\alpha 5$
(B) Expression d'Akt dans l'endoderme des souris sauvages ou invalidées pour la chaîne $\alpha 5$ (en duplicat)
(C) Analyse de l'état d'activation d'Akt dans le mésenchyme et l'endoderme de souris sauvages

2. Analyse de l'expression et de l'activation d'Akt *in vitro* dans les cellules intestinales matures

Nous avons vu dans la publication 1 que, alors que dans l'intestin en développement la chaîne $\alpha 5$ régule la voie Akt dans le compartiment mésenchymateux, dans l'intestin mature, la laminine-511 induit l'activation d'Akt dans les cellules épithéliales plus matures et non dans les cellules musculaires (publication 1, figure 7). La laminine-511 n'a par contre pas d'effet sur l'**expression** d'Akt dans ces cellules (non illustré). Sont présentés ci-dessous des résultats complémentaires relatifs à cette activation d'Akt par la chaîne $\alpha 5$ dans les cellules épithéliales :

a) Akt est spécifiquement activé par la laminine-511

Dans une première étape, j'ai déterminé le **temps optimal d'activation d'Akt par la laminine-511** dans les cellules en culture en réalisant une cinétique d'activation (figure 52). Cette cinétique montre que la laminine-511 induit la phosphorylation d'Akt dès 1 h d'adhésion et cette

phosphorylation est maintenue au moins jusqu'à 18h de culture avec un pic d'activation entre 3 et 6 heures. Nous avons choisi le temps le plus court (3h voire même 2h30, qui permettent une activation similaire) pour éviter le dépôt de matrice dans les puits contrôles (les cellules m-ICCL2 expriment la chaîne $\alpha 5$).

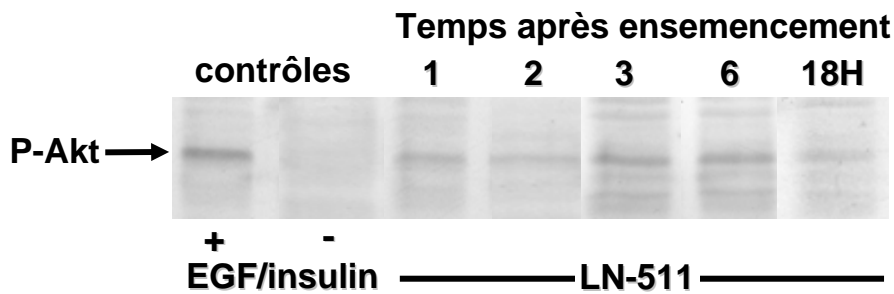


Figure 52 : Cinétique d'activation d'Akt dans les cellules mICCL2 en culture
 Pour les contrôles, les cellules ont été ensemencées sur plastique

Afin de m'assurer de la spécificité d'action de la laminine-511 pour l'activation d'Akt, j'ai ensemencé les cellules mICCL2 directement sur plastique (contrôle négatif) et sur une matrice de laminine-111 [purifiée à partir de tumeur EHS –Engelbreth Holm Swarm- induite chez la souris (Simo et al., 1991)], puis j'ai révélé par Western Blot l'état d'activation d'Akt. Une bande correspondant à Akt phosphorylé est retrouvée dans la piste correspondante aux cellules ensemencées sur Ln-111 mais son intensité est presque comparable à celle retrouvée pour les cellules ensemencées sur plastique. La normalisation par rapport à la quantité de protéines déposée sur le gel révèle bien une **activation négligeable d'Akt par la laminine-111 comparée à celle induite par la laminine-511** (Figure 53). De plus la laminine-511 a une action sur la morphologie cellulaire et nous avons vu précédemment que la laminine-511 influence ce phénotype cellulaire via Akt (publication 1, figure 6). Il n'en est rien pour la laminine-111. En effet, les cellules cultivées sur laminine-111 restent rondes et la wortmannine n'a aucun effet (Figure 54). Ceci démontre bien que la laminine-511 a une spécificité d'action qui lui est propre.

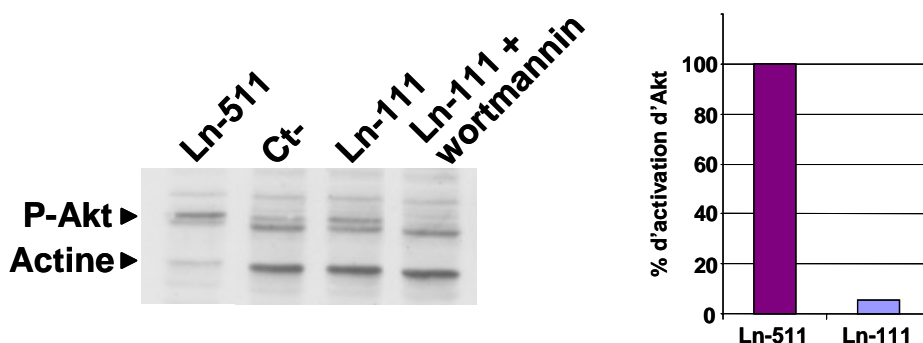


Figure 53: Analyse de la spécificité d'activation d'Akt par la laminine-511 par rapport à la laminine-111 par Western Blot.
 Le contrôle négatif (Ct-) correspond à des cellules ensemencées sur plastique

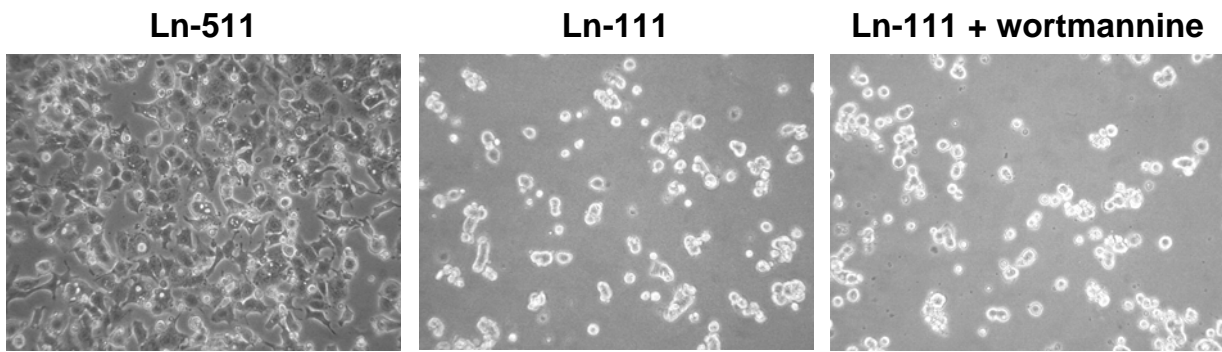


Figure 54 : Spécificité du rôle biologique de la laminine-511 par rapport à la laminine-111

b) Analyse de l'expression de PTEN dans les cellules intestinales cultivées sur laminine-511

PTEN étant un inhibiteur endogène de la voie PI3K/Akt (figure 40), il m'a paru intéressant de savoir si la laminine-511 était capable de moduler son expression. L'expression de PTEN est inchangée dans les cellules épithéliales intestinales cultivées sur laminine-511 (figure 55A). L'activation d'Akt par la laminine-511 dans ces cellules ne se fait donc pas de façon indirecte par la répression de cet inhibiteur endogène. Par contre son expression chute de 1,85 fois dans les cellules musculaires lisses intestinales ensemencées sur laminine-511 (Figure 55B). Pourtant la laminine-511 n'active pas Akt dans ces cellules (publication 1, figure 6). L'inhibition de PTEN en présence de laminine-511 n'est pas associée à une activation de la PI3K, ou du moins d'Akt, dans les cellules musculaires.

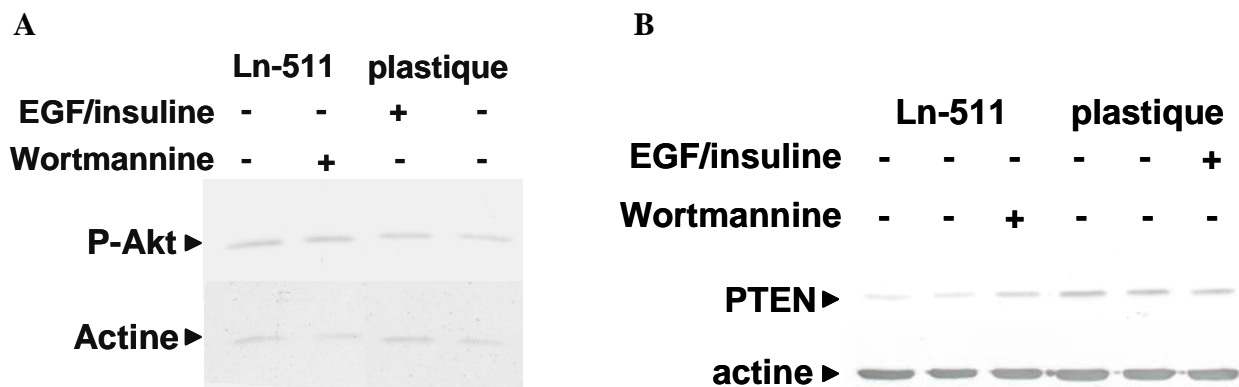


Figure 55 : Analyse de l'expression de PTEN par Western Blot dans les cellules épithéliales m-IC_{C12} (A) et musculaires lisses (B)

c) Recherche du récepteur membranaire impliqué dans l'activation d'Akt par la laminine-511

Le fait que la laminine-511 soit capable d'activer Akt via la PI3K pose la question de son mode d'action et donc du récepteur membranaire potentiellement impliqué. J'ai tout d'abord déterminé le répertoire de récepteurs de la laminine-511 porté par les cellules m-IC_{C12} (figure 56). **Les cellules épithéliales intestinales m-IC_{C12} présentent au niveau membranaire les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$ et $\beta 4$ d'intégrines et le récepteur Luthéran.** Nous pouvons donc postuler que la laminine-511 pourrait activer Akt *via* l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ou

$\alpha6\beta4$ ou *via* le Luthéran. Pour le démontrer, j'ai tenté de bloquer l'interaction de ces récepteurs avec la laminine-511 par l'utilisation d'anticorps bloquants spécifiques de ces récepteurs. Malheureusement l'inefficacité d'un nouveau lot d'anticorps anti-Akt-P ne m'a pas permis de révéler les résultats de cette expérience.

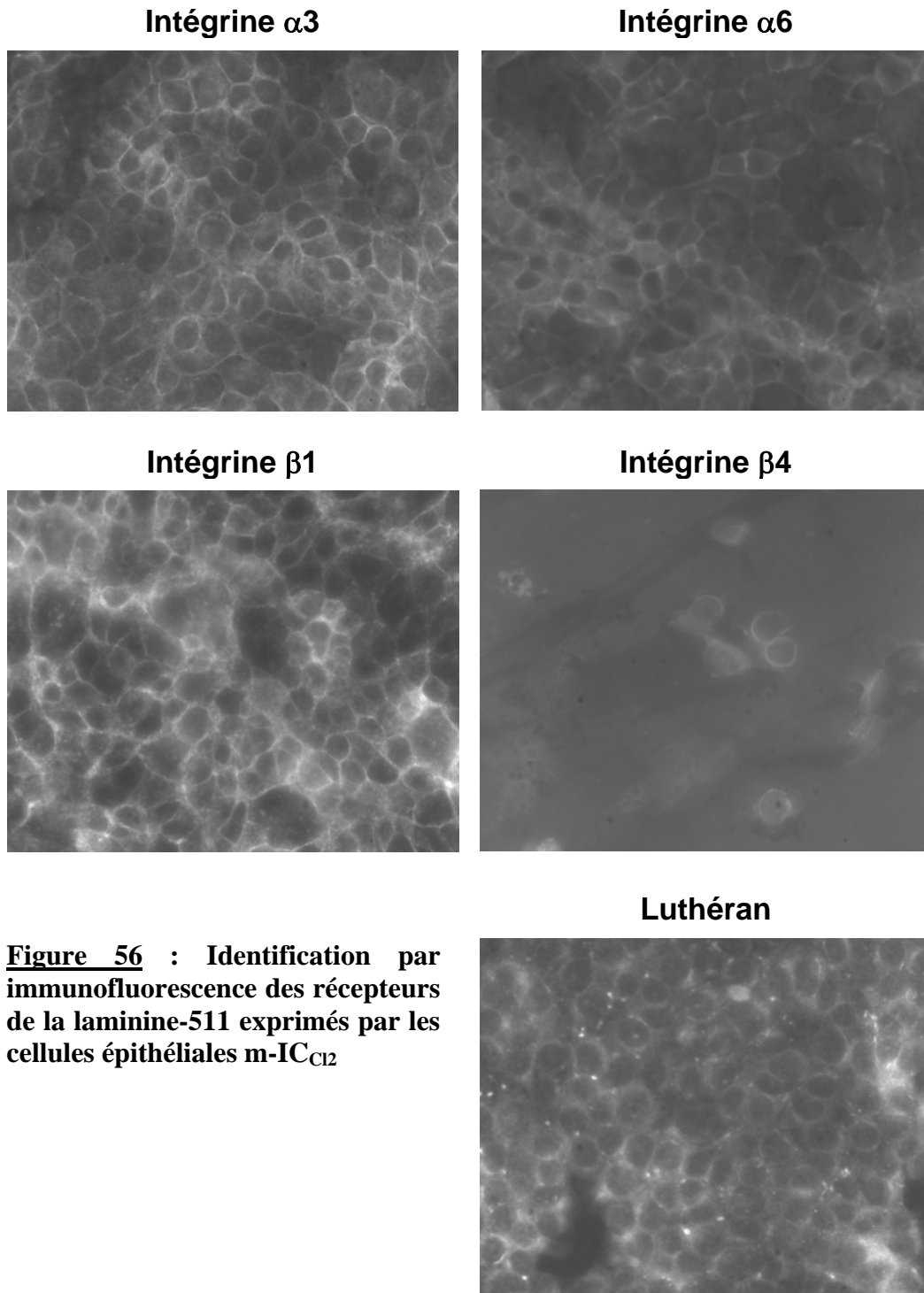


Figure 56 : Identification par immunofluorescence des récepteurs de la laminine-511 exprimés par les cellules épithéliales m-IC_{C12}

d) Recherche des substrats activés en aval de l'activation d'Akt par la laminine-511

Akt pouvant phosphoryler de nombreux substrats (Figure 39), j'ai tenté de déterminer quels substrats sont phosphorylés suite à l'activation d'Akt par la laminine-511 dans les cellules épithéliales intestinales. J'ai pour cela réalisé des Western Blots en utilisant un anticorps qui reconnaît spécifiquement les sites phosphorylés par Akt afin de révéler les substrats activés et de les identifier ensuite par spectrométrie de masse. Malheureusement, je n'ai trouvé aucune différence de bandes entre les pistes correspondant aux cellules cultivées sur laminine-511 ou sur plastique (Figure 57A), Akt n'étant pourtant pas activé sur plastique. Différents temps d'adhésion ont été testés allant de 2h30 à 5h. J'ai réalisé divers contrôles afin de m'assurer de l'efficacité de l'anticorps (Figure 57B) : l'ajout d'EGF et d'insuline, contrôle positif d'activation d'Akt, n'augmente pas le nombre de protéines phosphorylées comme il se devrait ; à l'inverse, l'ajout de wortmannine, inhibiteur de l'activation d'Akt, ne réduit pas ce nombre. Ainsi l'anticorps ne semble pas être efficace. Il révèle pourtant des protéines phosphorylées comme l'atteste un traitement des extraits protéiques à la phosphatase mais il semblerait qu'il ne s'agit pas de protéines phosphorylées par Akt.

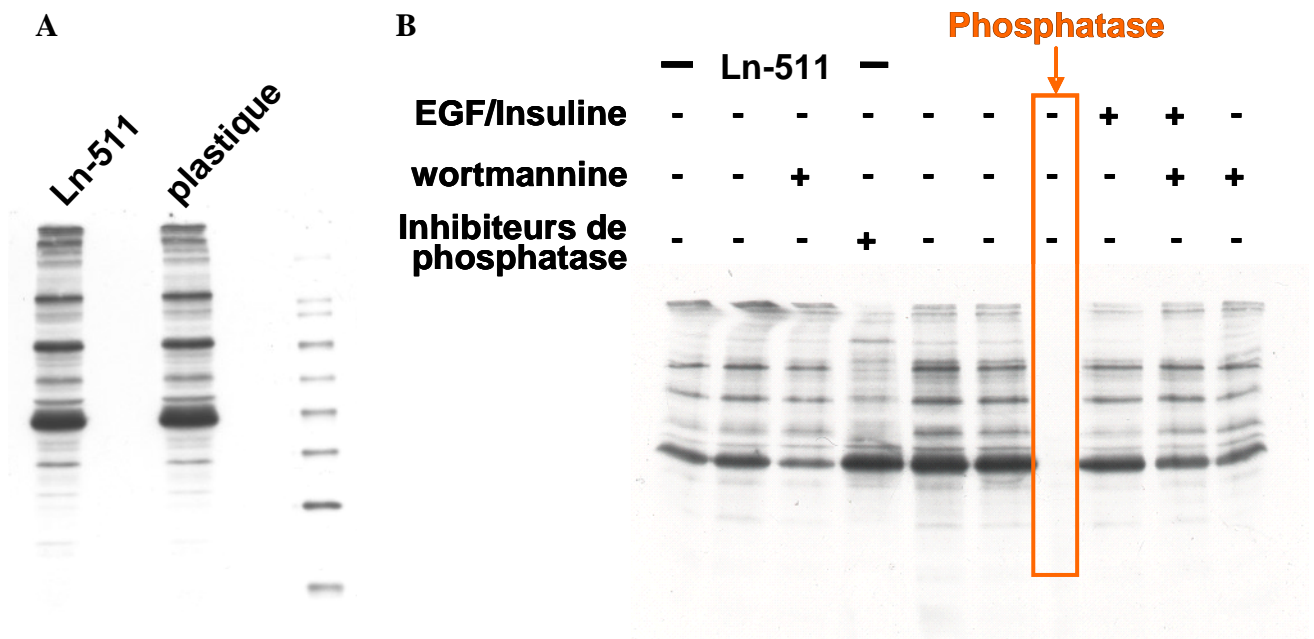


Figure 57 : Tentative de révélation des substrats spécifiquement activés par Akt dans les cellules m-IC_{C12} cultivées sur laminine-511 versus plastique (A). Les différents contrôles réalisés (B) rendent compte de l'inefficacité de l'anticorps. La piste encadrée en orange correspond à un échantillon protéique de cellules m-IC_{C12} traité à la phosphatase.

D. Détermination du rôle cellulaire de la chaîne $\alpha 5$

1. Confirmation du rôle de la laminine-511 dans la survie des cellules épithéliales intestinales par d'autres techniques

Le rôle anti-apoptotique de la laminine-511 a été démontré dans la publication 1 par des expériences où le nombre relatif de cellules survivantes a été estimé de par leur capacité à métaboliser le MTS (publication 1, figure 7). J'ai également démontré l'implication de la laminine-511 dans la survie cellulaire par des **immunomarquages de la caspase-3**. L'apoptose des cellules m-IC₁₂ a été induite par traitement au H₂O₂ comme décrit dans la publication 1. Le nombre total de cellules adhérentes après traitement a été compté grâce à un marquage nucléaire (DAPI) et, parmi ces cellules, le nombre de cellules en apoptose a été déterminé en comptant celles présentant un marquage pour la caspase-3 (figure 58). Les cellules se détachent de façon dose-dépendante de l'H₂O₂ qu'elles soient cultivées sur plastique ou sur laminine-511. Cependant, davantage de cellules survivent sur une matrice de laminine-511. En effet, parmi les cellules qui restent adhésives, 32% de celles ensemencées sur plastique ont déjà enclenché un processus apoptotique attesté par un marquage de la caspase-3 contre seulement 2,7% des cellules restantes sur laminine-511. **Ces résultats montrent que la laminine-511 prévient l'apoptose caspase-dépendante des cellules épithéliales intestinales.**

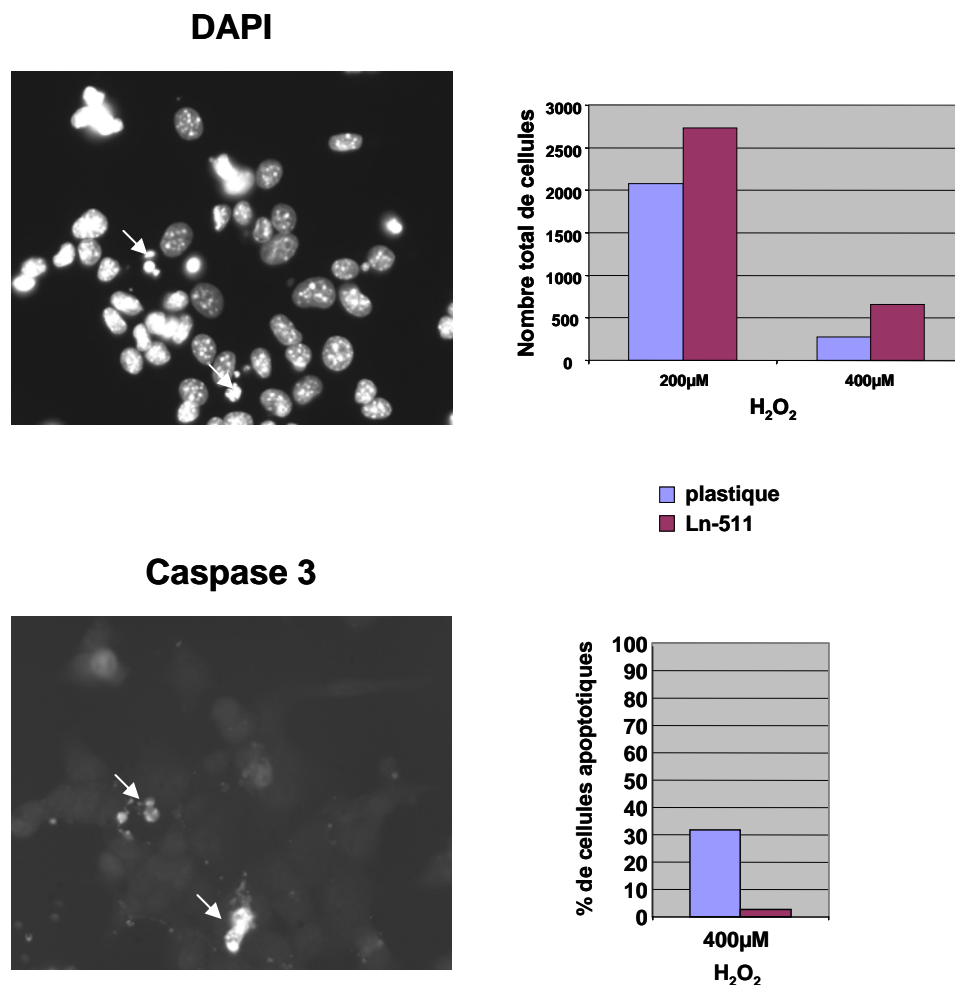


Figure 58: Immunomarquage de la caspase-3 dans des cellules épithéliales intestinales traitées par l'H₂O₂ et cultivées sur laminine-511 (pourpre) ou sur plastique (bleu). L'apoptose est révélée à la fois par le DAPI qui montre la fragmentation nucléaire et par un immunomarquage de la caspase-3 (flèches).

Des expériences de TUNEL réalisées sur des coupes d'intestin E15,5 semblent confirmer ce rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la survie cellulaire *in vivo*. Des résultats préliminaires ont en effet révélé l'apoptose de cellules endodermiques dans les coupes d'intestins invalidés pour la chaîne $\alpha 5$, alors que les coupes d'intestins sauvages ne présentent aucune cellule apoptotique (non illustré). La laminine-511 pourrait donc prévenir l'apoptose des cellules endodermiques intestinales lors du développement.

2. Détermination du rôle cellulaire de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans les cellules mésenchymateuses de l'intestin embryonnaire

Vu les défauts de la différenciation du muscle lisse intestinal causés par la délétion du gène Lama5 chez la souris, le rôle cellulaire de la chaîne $\alpha 5$ dans les cellules mésenchymateuses a été déterminé *in vitro* en comparant les capacités biologiques des cellules mésenchymateuses Lama5+/+ et Lama5-/. Ces expériences n'ont pas pu être réalisées sur les cellules endodermiques car elles ne survivent pas en culture.

Des tests d'**adhésion** ont été réalisés en comparant les propriétés adhésives des cellules mésenchymateuses Lama5+/+ et Lama5-/- à 1h, 2h45 et 4h30 après ensemencement sur plastique. 1h après adhésion, 10% des cellules sont adhérentes dans les 2 cas. Aucune différence d'attachement n'a été notée aux temps ultérieurs. De plus, les cellules s'étalent de la même façon. L'analyse de la **prolifération** a révélé que les cellules mésenchymateuses Lama5+/+ prolifèrent légèrement plus que les cellules Lama5-/- (figure 59A ; $p < 0,05$).

Les tests de **survie** n'ont révélé aucune différence de survie entre les cellules mésenchymateuses Lama5+/+ et Lama5-/- suite au traitement à l' H_2O_2 quelque soit la concentration (figure 59B). L'induction de l'apoptose a été réalisée entre 5 et 72h après ensemencement (les cellules mésenchymateuses ne subsistent guère plus longtemps en culture). Ces temps ne sont peut-être pas suffisamment longs pour permettre une sécrétion de laminine contenant la chaîne $\alpha 5$ par les cellules sauvage en quantité suffisamment importante pour observer un effet biologique. Le fait que les cellules mésenchymateuse Lama5-/- placées sur laminine-511 voit leur survie augmentée suggère tout de même un rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la survie des cellules mésenchymateuses.

J'ai ensuite comparé les **capacités migratoires** des cellules mésenchymateuses Lama5+/+ et Lama5-/- de la même façon que celle décrite dans la publication 1. 24h après ensemencement, les cellules n'ont pas migré quelque soit leur génotype. Après 48h, elles se sont même rétractées.

La chaîne $\alpha 5$ de laminine semble donc pouvoir influencer la prolifération des cellules mésenchymateuses mais de façon très modérée. Elles ont peut-être également un rôle dans la survie de ces cellules qu'il faudra confirmer.

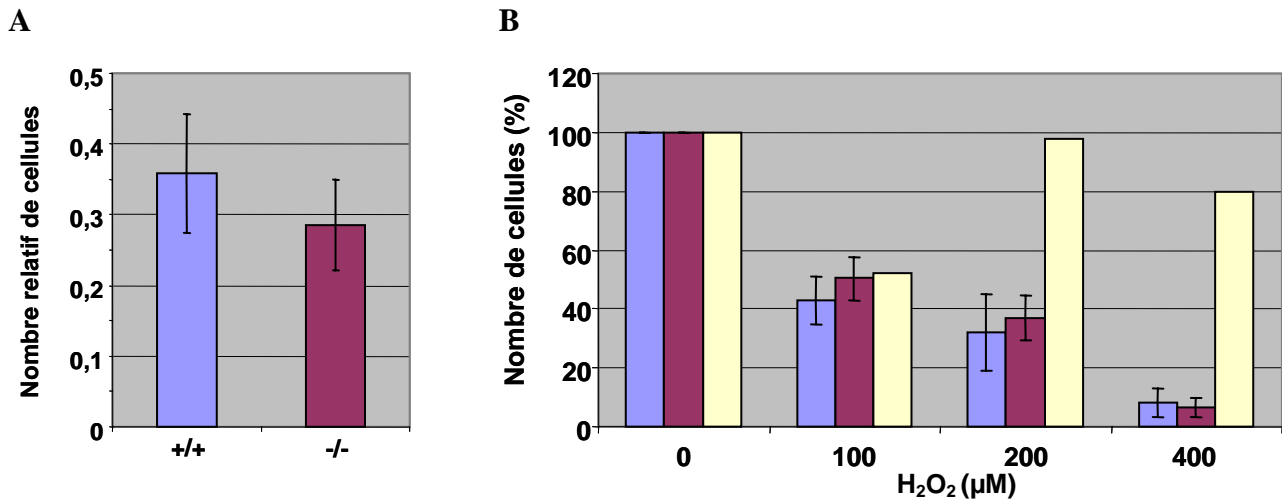


Figure 59 : Test de prolifération (A) et de survie (B) des cellules mésenchymateuses exprimant ou non la chaîne $\alpha 5$

Test de prolifération : n=6 avec chaque expérience réalisée en sextuplat ; p=0,0468

Test de survie : n=4 avec chaque expérience réalisée en duplicat

■ Lama5+/+ ■ Lama5-/- ■ Lama-/- + Ln-511

E. Identification d'une nouvelle isoforme de laminine dans l'intestin

Un autre aspect qui ressort de mon travail de thèse est lié au mécanisme d'assemblage des laminines. En effet, les ARNs correspondants aux chaînes $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$ de laminine ne sont pas diminués dans les échantillons d'intestins Lama5^{-/-}, alors qu'une chute de l'expression de ces protéines avait été observée par immunofluorescence (Bolcato-Bellemin et al., 2003). La confrontation de ces 2 résultats parle en faveur d'une altération des mécanismes d'assemblage de ces chaînes liée à l'absence de chaîne $\alpha 5$, plutôt que d'une répression transcriptionnelle de ces gènes. La liaison de la chaîne $\alpha 5$ aux chaînes β et γ semble donc indispensable à leur sécrétion hors de la cellule, ce qui avait déjà été montré pour la chaîne $\alpha 1$ (Yurchenco et al., 1997). La diminution de la sécrétion des chaînes $\beta 2$ et $\gamma 2$ suggère qu'il pourrait exister une nouvelle isoforme de laminine dans l'intestin, la laminine-522. L'assemblage des chaînes $\alpha 5$, $\beta 2$ et $\gamma 2$ n'ayant jamais été démontré au moment de ce travail, j'ai tout d'abord vérifié l'expression de ces chaînes de laminine dans l'intestin embryonnaire normal, afin de voir si elles sont co-exprimées (Figure 60). Les sous-unités $\alpha 5$, $\beta 2$ et $\gamma 2$ sont toutes les trois fortement exprimées dans le muscle. Toutefois, alors que la chaîne $\alpha 5$ est davantage exprimée dans la couche circulaire interne du muscle intestinal que dans l'externe, les chaînes $\beta 2$ et $\gamma 2$ sont elles exprimées avec la même intensité dans les deux couches musculaires. Par des expériences d'immunoprécipitation suivie de Western Blot, j'ai tenté de valider l'existence de cette potentielle nouvelle isoforme de laminine dans l'intestin. J'ai ainsi pu démontrer l'assemblage des chaînes $\alpha 5$ et $\beta 2$ entre elles (identifiées par immunoblot). Par contre, aucun des anticorps testés, dirigés contre la chaîne $\gamma 2$, n'a été efficace en Western Blot. Seule la présence d'une bande de 155kD correspondant à cette chaîne dans les protéines immunoprécipitées avec la chaîne $\beta 2$ suggère le réel assemblage de ces chaînes dans les intestins sauvages (figure 61). En parallèle, l'existence de cette isoforme de laminine a été confirmée par une autre étude (Siler et al., 2002) dans la moelle osseuse et cette nouvelle isoforme a été communément admise.

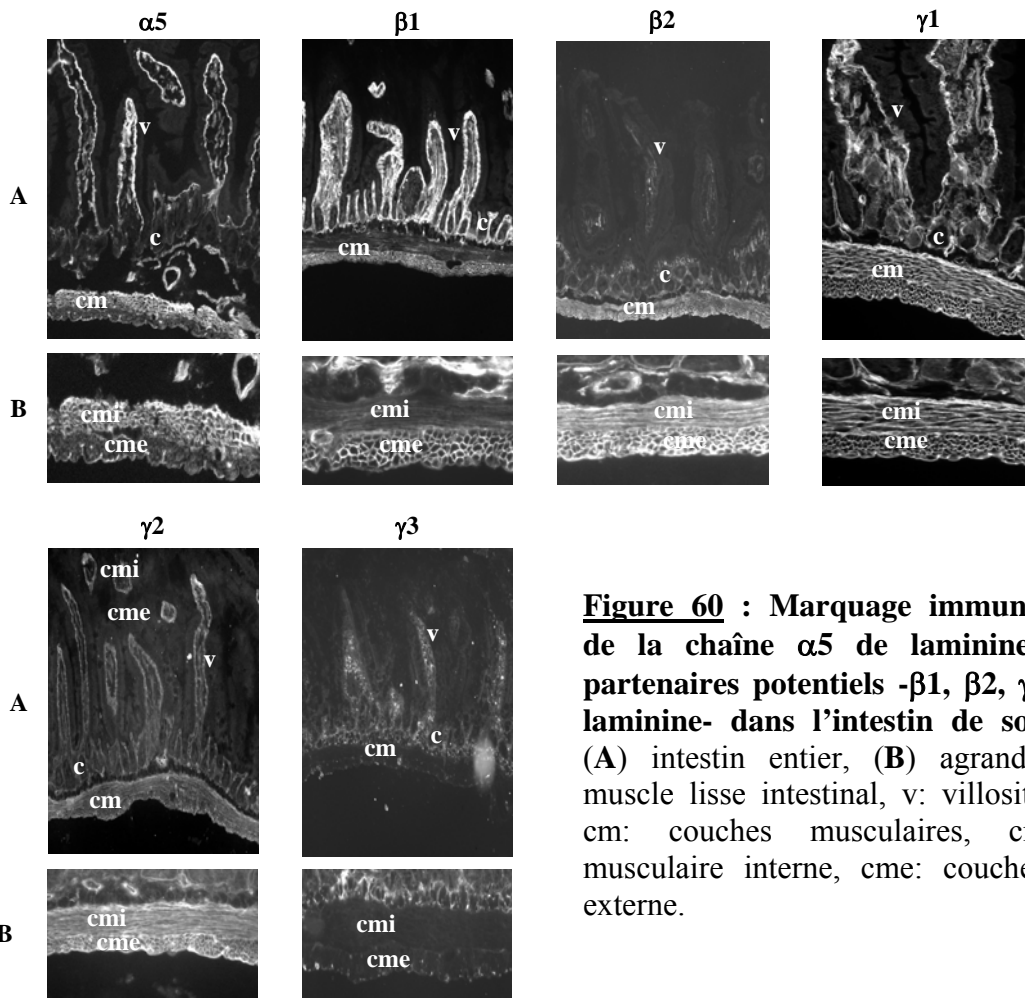


Figure 60 : Marquage immunofluorescent de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et de ses partenaires potentiels - $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ de laminine- dans l'intestin de souris adulte. (A) intestin entier, (B) agrandissement du muscle lisse intestinal, v: villosité, c: crypte, cm: couches musculaires, cmi: couche musculaire interne, cme: couche musculaire externe.

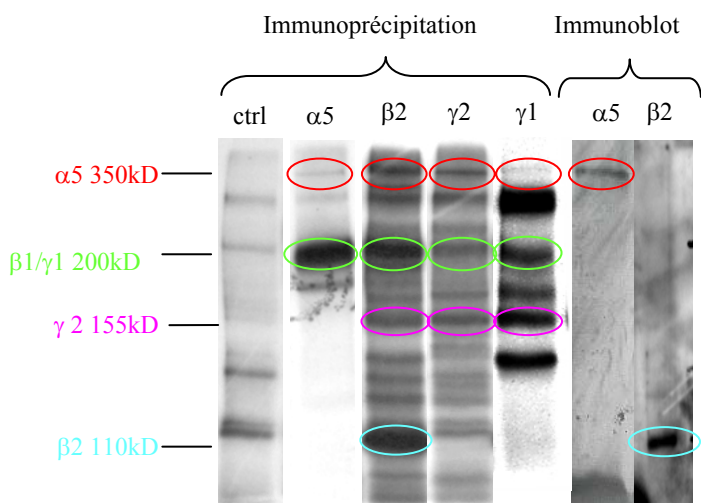


Figure 61: Immunoprécipitation des chaînes $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 2$ et $\gamma 1$ et immunoblot à partir d'extraits de cellules musculaires lisses intestinales.

Les différentes chaînes ont été précipitées par un anticorps spécifique. La migration de ces immunoprécipités sur gel révèle des bandes correspondant à la protéine ciblée et à ses partenaires co-précipités. Le poids moléculaire des protéines est estimé par rapport au marqueur *Prestained Low*. Les chaînes $\alpha 5$ et $\beta 2$ ont pu être identifiées par immunoblot sur extrait protéique. (ctrl): protéines immunoprécipitées aspécifiquement par les billes sans premier anticorps.

Discussion des résultats

VI. Discussion des résultats

Ce travail a permis de démontrer que la chaîne $\alpha 5$ est bien capable de réguler l'expression de gènes cibles et se comporte donc comme une molécule signal qui peut influencer le devenir cellulaire et l'intégrité tissulaire.

4 points essentiels ressortent de cette étude :

♦ La chaîne $\alpha 5$ de laminine favorise la différenciation musculaire et épithéliale

Ces résultats ont permis d'attribuer le phénotype musculaire des intestins déficients en chaîne $\alpha 5$ de laminine à une répression transcriptionnelle de la **desmine**, protéine des filaments intermédiaires classiquement utilisée comme marqueur de la différenciation du muscle lisse, de **Fhl1**, un régulateur de la différenciation des cellules musculaires (Brown et al., 1999), et à une sur-expression de **Tal1** (publication 1, figure 2), connu pour être un inhibiteur de la différenciation musculaire (Ema et al., 2003). Parallèlement à la modification de ces acteurs du processus d'altération du développement du muscle intestinal, j'ai révélé une sur-expression de facteurs impliqués dans la **régénération musculaire** à savoir : (i) MyoD, un facteur de transcription impliqué dans le lignage des cellules musculaires squelettiques mais qui peut également être exprimé dans des cellules intestinales et guider leur différenciation en cellules musculaires (Gerhart et al., 2001) et (ii) Sfrp2, inhibiteur soluble de la voie Wnt, dont l'expression augmente fortement lors de la régénération musculaire (Levin et al., 2001).

Le fait que l'absence de chaîne $\alpha 5$ induise une dérégulation de la **desmine** qui participe à la stabilisation du tissu musculaire lors de la contraction, une dérégulation de l'expression du **neuropeptide Y**, hormone stimulatrice de la contraction du muscle intestinal, et du récepteur à la **cholécystokinine A**, médiateur de la digestion engendrant la libération d'enzymes digestives et de bile, laisse présumer que la chaîne $\alpha 5$ a un rôle majeur dans la **fonctionnalité** du muscle intestinal.

Par ailleurs, il a été particulièrement intéressant de déceler une **chute d'expression de 15 marqueurs de la différenciation entérocytaire**, notamment des enzymes digestives aminopeptidase N, méprine 1A, dipeptidylpeptidase IV, de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides (Fabp1 et 2, ApoA1, Hmgcs2...). Des expériences *in vitro* ont également révélé que des cellules intestinales cultivées sur des matrices extraites de muscle, enrichies en laminine-511, présentent une stimulation de l'apolipoprotéine A-IV (Schreider et al., 2001). Pourtant aucune anomalie n'a été notée lors de l'analyse ultrastructurale des entérocytes des intestins Lama5 $-/-$ en microscopie électronique. La bordure en brosse des entérocytes invalidés est bien structurée et la villine avait été trouvée normalement exprimée (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Cette présente étude a néanmoins révélé une faille dans la différenciation entérocytaire en l'absence de chaîne $\alpha 5$ suggérant l'importance du rôle de cette chaîne dans le développement entérocytaire tardif et dans la complète fonctionnalité des entérocytes matures en terme de digestion et de métabolisme des lipides. La compensation de l'absence de chaîne $\alpha 5$ par une expression sous-endodermique ectopique des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ (Bolcato-Bellemin et al., 2003) explique peut-être l'absence de défauts ultrastructuraux des entérocytes mais ne peuvent se substituer à la chaîne $\alpha 5$ pour leur différenciation fonctionnelle.

Ces résultats ont donc révélé l'importance de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le développement et la fonctionnalité des 2 compartiments de l'intestin et suggèrent un rôle important de cette molécule extracellulaire dans la digestion, le métabolisme et la progression du bol alimentaire. Il est dommage que la létalité embryonnaire des souris Lama5 $-/-$ nous empêche de le confirmer au niveau physiologique.

◆ La chaîne $\alpha 5$ est capable d'induire la voie PI3K/Akt dans l'intestin

Par cette étude, j'ai montré que la chaîne $\alpha 5$ de laminine induit la voie PI3K/Akt dans l'intestin embryonnaire et également dans l'intestin mature.

Dans l'intestin embryonnaire, l'absence de chaîne $\alpha 5$ engendre une chute de l'expression et de l'activation d'Akt attribuée au compartiment **mésenchymateux**. Par contre, dans l'intestin mature, la laminine-511 active Akt dans les cellules épithéliales mais pas dans les cellules musculaires lisses qui dérivent du compartiment mésenchymateux. Ces résultats montrent une certaine divergence au niveau du compartiment où se fait la régulation d'Akt par la chaîne $\alpha 5$. Il faut bien sûr tenir compte du fait que ces résultats ont été obtenus à partir de 2 systèmes d'étude différents, *in vivo* sur un modèle d'inactivation génique pour l'intestin embryonnaire, et *in vitro* pour les cellules intestinales matures avec l'avantage de montrer l'effet direct de la chaîne $\alpha 5$, mais qui est hors du contexte d'un microenvironnement tissulaire complet. Toutefois, ces données reflètent vraisemblablement une **fonction différente de la signalisation laminine- $\alpha 5$ /Akt selon le stade de développement ou de maturation de l'intestin**. Akt pouvant intervenir dans la régulation de nombreux processus cellulaires, il est tout à fait probable que la chaîne $\alpha 5$ induise l'expression et l'activation d'Akt spécifiquement dans le mésenchyme lors du développement intestinal pour entamer des processus cellulaires nécessaires à l'élaboration du muscle lisse ou de la lamina propria. A ma connaissance, aucune autre étude n'a porté sur une éventuelle fonction d'Akt dans le développement. Par ailleurs, la chaîne $\alpha 5$ induirait l'activation d'Akt dans l'épithélium de l'intestin mature pour enclencher des processus cellulaires nécessaires, par exemple, au maintien de l'homéostasie de l'épithélium digestif. Akt participe en effet à la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires (Kandel et al., 1999). J'ai effectivement démontré que **l'activation d'Akt par la laminine-511 favorise la survie des cellules épithéliales intestinales**. Ce résultat est appuyé par les travaux de Gu et al. qui ont montré par des expériences *in vitro* que la laminine-511 favorise, *via* Akt, la survie de cellules épithéliales pulmonaires A549 face à une privation en sérum (Gu et al., 2002). Par ailleurs, nous avons vu que **la laminine-511 confère, via la PI3K, une morphologie aux cellules épithéliales intestinales m-IC_{CL2} en culture**, ce qui suggère peut-être un rôle de la signalétique $\alpha 5$ /Akt dans le **maintien de la polarité** des cellules épithéliales ou dans la **différenciation** des cellules souches le long de l'axe cryptovillostaire. Deux autres études montrant l'importance de la PI3K pour la différenciation entérocytaire (Laprise et al., 2002) et pour celle de cellules épithéliales dentaires (Fukumoto et al., 2006) appuient un potentiel rôle de la signalisation laminine $\alpha 5$ /Akt dans la différenciation cellulaire.

Il a, par ailleurs, été intéressant d'observer que la chaîne $\alpha 5$ peut induire à la fois l'**expression** et l'**activation** d'Akt. La régulation de l'expression d'Akt n'a pas été bien documentée. Concernant le mécanisme d'activation d'Akt par la chaîne $\alpha 5$, je n'ai pas pu identifier le récepteur membranaire impliqué. Dufour et al. (2004) ont montré que l'inhibition de la sous-unité $\beta 1$ d'intégrine induisait une baisse d'activation d'Akt1 dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15. Par ailleurs, Fukumoto et al. (2005) ont montré que l'interaction entre la laminine-511 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est nécessaire à l'activation de la voie PI3K/Akt dans l'épithélium dentaire. D'autres études ont encore montré que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et le dystroglycane pouvaient également être impliqués dans l'activation d'Akt (Bao et al., 2004 et Langenbach et Rando al., 2002 respectivement).

J'é mets l'hypothèse que l'activation d'Akt par la chaîne $\alpha 5$ pourrait peut-être aussi se faire par la voie classique des récepteurs tyrosine kinases. En effet, la chaîne $\alpha 5$ porte des modules de type EGF au niveau de ses domaines III et V. Ces modules EGF pourraient interagir directement avec des récepteurs tyrosine kinases pour activer la PI3K. Il serait très intéressant de pouvoir tester cette hypothèse expérimentalement.

◆ La chaîne $\alpha 5$ induit la voie Wnt dans l'intestin

Les expériences de « microarray » ont révélé la dérégulation de plusieurs gènes de la voie Wnt. Les résultats montrent une certaine incohérence au niveau du sens de dérégulation de ces gènes. Seule la dérégulation de certains gènes a pu être confirmée de façon certaine. Il s'agit de la surexpression du récepteur Fzd2, des gènes cibles Pitx2, Msx1 et MyoD1 et de Sfrp2 qui est classiquement décrit comme un inhibiteur de la voie Wnt mais qui s'est également révélé être agoniste dans certains cas (Jones et Jomary, 2002). La relativement faible expression de Wnt10b dans l'intestin n'a pas rendu possible la confirmation de sa sous-expression par RT-QPCR du fait d'une trop grande différence entre les cycles de sortie du gène Wnt10b et du gène utilisé pour la normalisation. Par contre, nous avons pu montrer la sous-expression et une délocalisation ectopique de Wnt10b en absence de chaîne $\alpha 5$ dans un tissu où ce gène est normalement bien exprimé, le bourgeon dentaire. La divergence de ces résultats peut résulter de la complexité des mécanismes moléculaires avec l'existence de nombreuses isoformes de facteurs Wnt et des acteurs de cette voie, de la complexité des éventuelles phénomènes compensatoires et de la complexité liée aux différences de mécanismes moléculaires entre le compartiment épithélial et le compartiment mésenchymateux. Dans l'ensemble, les résultats issus de l'analyse *in vivo* montrent plutôt une **augmentation de l'activité de la voie Wnt en absence de la chaîne $\alpha 5$ de laminine**. Cela suggère que la présence de laminine contenant la chaîne $\alpha 5$ pourrait réprimer la voie Wnt.

L'analyse de l'effet de la laminine-511 sur la voie Wnt *in vitro* dans des cellules intestinales transfectées avec la construction TOPFLASH a montré que la laminine-511 n'a pas d'effet activateur sur la voie Wnt, du moins dans les cellules épithéliales, cette expérience n'ayant pas pu être réalisée ni sur les cellules musculaires intestinales ni sur les cellules mésenchymateuses, du fait d'un trop faible taux de cellules transfectées. Une éventuelle action répressive serait difficilement mise en évidence par ce système du fait de la faible, voire inexistante, activité basale de la voie Wnt dans ces cellules. Il n'est donc pas exclu que la laminine-511 puisse réprimer la voie Wnt ou que cette potentielle modulation prenne place dans le compartiment musculaire de l'intestin ou dans la lamina propria ou alors qu'elle existe seulement dans le contexte du développement embryonnaire.

Ce que nous pouvons conclure de cette étude est que **l'absence de chaîne $\alpha 5$ de laminine a un effet permissif sur l'activation de la voie Wnt dans l'intestin**.

◆ La chaîne $\alpha 5$ régule l'expression de gènes cibles lui conférant un rôle biologique varié dans la prolifération, la survie ou encore la migration cellulaire

J'ai montré que la chaîne $\alpha 5$ stimule la **prolifération** des cellules épithéliales intestinales en culture et que, à l'inverse, l'absence d'expression de chaîne $\alpha 5$ dans les cellules mésenchymateuses diminue leur prolifération. L'analyse *in vivo* des intestins embryonnaires Lama5^{-/-} avait effectivement révélé par immunomarquage du KI67 un défaut de la prolifération dans le compartiment mésenchymateux (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Les données du « microarray » ont révélé dans les intestins Lama5^{-/-} une sous-expression de la **choline kinase** qui permet la production de 2 phospholipides induisant la division cellulaire, de la **primase 2**, essentielle pour la réplication de l'ADN, et de la **cycline A2** qui déclenche la phase S et la transition S/G2 (Annexe 2). De plus, **MAPK14**, un inhibiteur de la prolifération cellulaire, la **culline 3**, inhibiteur de la cycline E et donc de la transition G1/S, et **Chek1**, inhibiteur de l'entrée en mitose par inhibition de CDC25C et du complexe CDC-cycline B, ont été trouvés sur-exprimés dans les intestins Lama5^{-/-} (Annexe 1). La prolifération des cellules épithéliales intestinales induite par la laminine-511 pourrait être attribuée à ces 6 gènes régulateurs du cycle cellulaire, dont l'expression semble être régulée par la chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin.

L'**effet anti-apoptotique de la chaîne $\alpha 5$** semble clairement être attribué à l'**activation d'Akt**, la wortmannine inhibant totalement cet effet. Le fait que le nombre de cellules présentant un marquage de la caspase-3 suite à l'induction de l'apoptose par l'H₂O₂ soit diminué sur laminine-511, montre que cette isoforme est capable d'inhiber l'apoptose caspase-dépendante des cellules

épithéliales intestinales. De plus, **Sox 4**, potentiel médiateur apoptotique, et la **caspase-14**, surexprimée dans des cellules épithéliales suite à leur perte d'interaction avec des éléments matriciels (Pristitto et al., 2002), ont été trouvés sur-exprimés dans les intestins Lama5 -/-. La **migration** des cellules épithéliales intestinales induite par la laminine-511 n'a pas pu être corrélée à des gènes trouvés dérégulés dans les intestins Lama5 -/-.

Au cours de ce travail, j'ai été confronté à certaines difficultés ou questions techniques :

- Avec du recul, je pense que l'utilisation de la technique d'hybridation différentielle sur puce à ADNc a été une bonne stratégie qui a permis de répondre à nos objectifs. Nous avons opté pour l'utilisation d'une puce « maison », plutôt que les puces de fabrication Affymétrie. Ce choix a, certes, été très formateur, car il m'a permis de participer à la création des puces, et aux expériences d'hybridation et de réaliser personnellement la quantification et l'analyse des données ; mais il est vrai que d'opter pour les puces Affymétrie aurait été une formule clé en main qui aurait fait gagner un temps considérable. Le fait que les échantillons mutants d'une part et sauvages d'autre part ségrégent ensemble et que des gènes pour lesquels une modification d'expression avait déjà été démontrée soient également ressortis dans cette étude valide pleinement l'efficacité de la technique utilisée; j'ai toutefois obtenu un assez grand nombre de faux positifs supérieur au pourcentage classique obtenus avec les puces Affymétrie.

- Le nombre de gènes présents sur la puce utilisée est loin de couvrir tout le génome murin. Il est en effet frustrant de constater que les puces utilisées au début de ce travail comportaient un nombre relativement petit de gènes par rapport aux puces disponibles actuellement. Nous sommes certainement passés à côté de gènes cibles de la chaîne $\alpha 5$ qui auraient pu être intéressants. L'avantage est que cela a restreint de fait le nombre de gènes sélectionnés qui est déjà important.

- La grande différence de sévérité phénotypique possible entre 2 mutants a rendu l'analyse des résultats particulièrement difficile, d'où l'importance des 2 étapes de sélection de gènes pour les expériences de « microarray ». Il a ensuite été difficile de conclure à la non confirmation d'un gène. En effet, un grand nombre d'expériences a été souvent nécessaire pour pouvoir trancher, car pour les expériences de confirmation, le calcul des ratios comparant les expressions entre les échantillons Lama5 +/+ et Lama5 -/- prend en compte les mutants ne présentant pas de différences (phénotype peut-être moins sévère) alors que l'analyse « microarray » prend en compte uniquement les ratios correspondant aux échantillons $\alpha 5$ -/- qui présentent des gènes modifiés. C'est pourquoi nous avons considéré significatif un taux de différence d'expression de 1,5 fois pour les expériences de RT-PCR alors qu'il était de 2 pour les expériences de « microarray ».

- Un autre point discutable est que la laminine-511 utilisée pour les études *in vitro* n'est pas pure mais correspond à de la matrice riche en laminine-511 sécrétée par des cellules en culture. Cependant, la seule solution de laminine-511 purifiée disponible dans le commerce correspond en fait à une forme protéolysée privée de certains domaines d'interaction avec les récepteurs membranaires. Ainsi la signalisation induite par cette forme protéolysée ne reflète probablement pas la réalité. Aussi j'ai préféré opter pour une laminine-511 impure mais intègre. La chaîne $\alpha 5$ est la seule chaîne α de laminine sécrétée par ces cellules. De plus, l'impureté de cette matrice n'est pas forcément un point négatif. Au contraire, on peut considérer qu'elle récapitule l'environnement cellulaire réel où les laminines interagissent avec d'autres protéines de la matrice extra-cellulaire.

Impact

Ces résultats ont mis en évidence le rôle clé de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la différenciation musculaire mais aussi épithéliale de l'intestin. Par le contrôle de voies de signalisation spécifiques, la chaîne $\alpha 5$ est capable de réguler l'expression de gènes cibles lui conférant un rôle dans les phénomènes de prolifération, de survie, de migration et de différenciation cellulaire. Ces résultats ont posé les bases moléculaires du phénotype intestinal des souris Lama5 $-/-$ et permettent de mieux comprendre l'impact de l'environnement cellulaire médié par les laminines dans le développement et la fonction intestinale.

2^{ème} Partie :

**L'inactivation génique d'un récepteur de la chaîne $\alpha 5$
de laminine, le Luthéran, engendre des anomalies
rénales et intestinales chez la souris**

L'inactivation génique d'un récepteur de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, le Luthéran, engendre des anomalies rénale et intestinale chez la souris

I. Base du travail

La signalisation induite par la chaîne $\alpha 5$ de laminine est médiée par son interaction avec des récepteurs membranaires. Nous avons vu dans l'introduction que la chaîne $\alpha 5$ peut lier différentes intégrines, le Luthéran, le dystroglycane et des syndécanes. Parmi ces récepteurs, le Luthéran est le seul à interagir spécifiquement et **uniquement** avec les laminines contenant la **chaîne $\alpha 5$** . Le Luthéran a été tout d'abord découvert à la surface des globules rouges, chez l'homme, système dans lequel il a été le plus étudié. Il possède pourtant un profil d'expression très large dans de nombreux tissus et organes (Moulson et al., 2001). Toutefois, sa fonction n'y a été que très peu étudiée. Vu que le Luthéran est un récepteur exclusif de la chaîne $\alpha 5$, il nous a paru particulièrement intéressant de définir son rôle dans l'intestin afin de déterminer quelle fonction cellulaire la chaîne $\alpha 5$ médie par son intermédiaire. Durant mon doctorat, j'ai collaboré avec l'équipe du Dr C. Le Van Kim de l'unité INSERM U665-Paris qui a généré des **souris invalidées pour le Luthéran** pour analyser leur phénotype. Lors de cette étude, j'ai réalisé tout le travail concernant l'intestin.

II. Résumé des résultats

Par cette étude, j'ai montré que le Luthéran présentait une **forte expression dans l'intestin** principalement au niveau des 2 couches musculaires, dans la séreuse, la musculaire muqueuse, les vaisseaux sanguins et à la base des cellules épithéliales tout le long de l'axe crypto-villositaire dans l'intestin grêle et le long des glandes coliques. Afin de déterminer sa fonction, l'inactivation génique du Luthéran a été réalisée chez la souris. Ces souris sont viables et se développent normalement. L'analyse des souris homozygotes mutantes nous a permis de constater que, contrairement à l'homme, les globules rouges murins n'expriment pas de Luthéran. Des anomalies des glomérules rénaux et du muscle intestinal ont été observées. En effet, bien qu'aucune altération de la fonction rénale n'ait été remarquée, plus de 90% des glomérules présentent des anomalies structurales avec un nombre réduit de capillaires et des défauts d'architecture de la lame basale glomérulaire. Au niveau de l'intestin, les mutants présentent un muscle lisse épaissi associé à une désorganisation des myofilaments, à un défaut de la cohésion intercellulaire, à une perturbation mitochondriale et parfois à une nécrose nucléaire. Pour autant, l'analyse du transit intestinal n'a révélé aucune perturbation. Une chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et une compensation par une expression ectopique de la chaîne $\alpha 4$ a été notée au niveau de la séreuse des intestins mutants. Cette étude nous a permis de montrer que le Luthéran est impliqué dans le **maintien d'une organisation normale des lames basales intestinales et rénales**. Son absence n'induit cependant **pas de dysfonctionnement physiologique** de ces deux organes.

Les résultats détaillés sont présentés dans la publication 2 et dans les résultats complémentaires à cette publication :

- **Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse:** C. Rahuel, **L. Ritié***, A. Filipe*, W. El Nemer, N. Patey-Mariaud, D. Eladari, J-P. Cartron, P. Simon-Assmann, C. Le Van Kim, and Y. Colin, Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2008, 294 :F393-F406. *deuxièmes co-auteurs – **page 150**
- **Résultats complémentaires – page 166**

Publication 2 :

Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse

Cécile Rahuel, Anne Filipe, Léa Ritie, Wassim El Nemer, Natacha Patey-Mariaud, Dominique Eladari, Jean-Pierre Cartron, Patricia Simon-Assmann, Caroline Le Van Kim and Yves Colin

Am J Physiol Renal Physiol 294:393-406, 2008. First published Nov 21, 2007;
doi:10.1152/ajprenal.00315.2007

You might find this additional information useful...

This article cites 61 articles, 30 of which you can access free at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/294/2/F393#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/294/2/F393>

Additional material and information about *AJP - Renal Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajprenal>

This information is current as of June 6, 2008 .

Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse

Cécile RAHUEL, Anne FILIPE, Léa RITIÉ, Wassim EL NEMER, Natacha PATEY-MARIAUD, Dominique ELADARI, Jean-Pierre CARTRON, Patricia SIMON-ASSMANN, Caroline LE VAN KIM, and Yves COLIN

AJP - Renal Physiology, 2008, 294, Pages 393-406

Pages 152-165 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00315.2007>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Résultats complémentaires

IV. Résultats complémentaires

A. Détail de l'analyse des paramètres généraux corporels, physiologiques et biochimiques

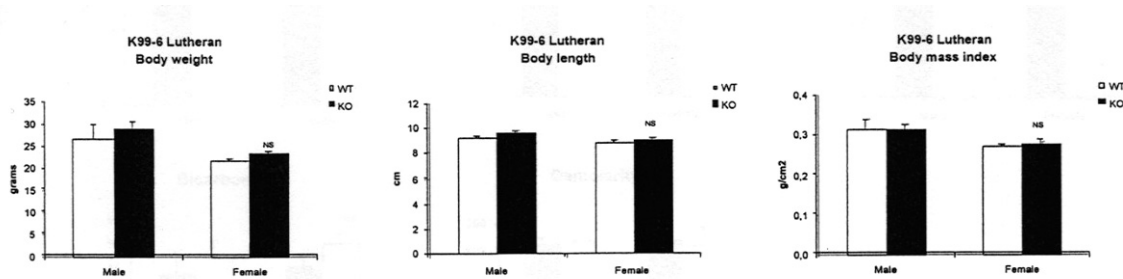


Figure 62 : Poids corporel, taille et indice de masse corporel

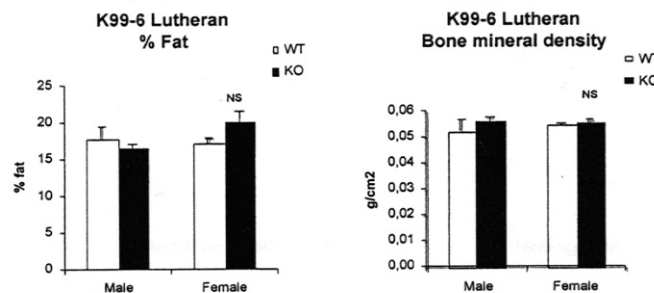


Figure 63 : Densitométrie par rayons X (Dexa scan). Cette technique a été utilisée pour évaluer la densité de masse grasseuse et la densité osseuse

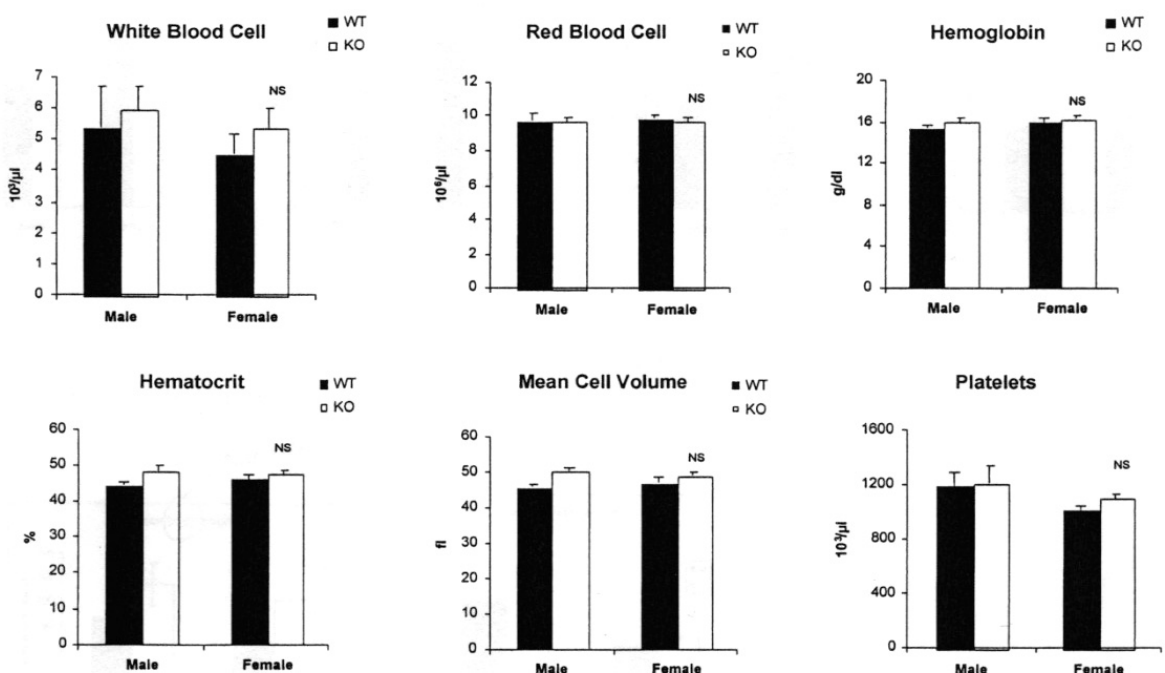


Figure 64 : Hématologie

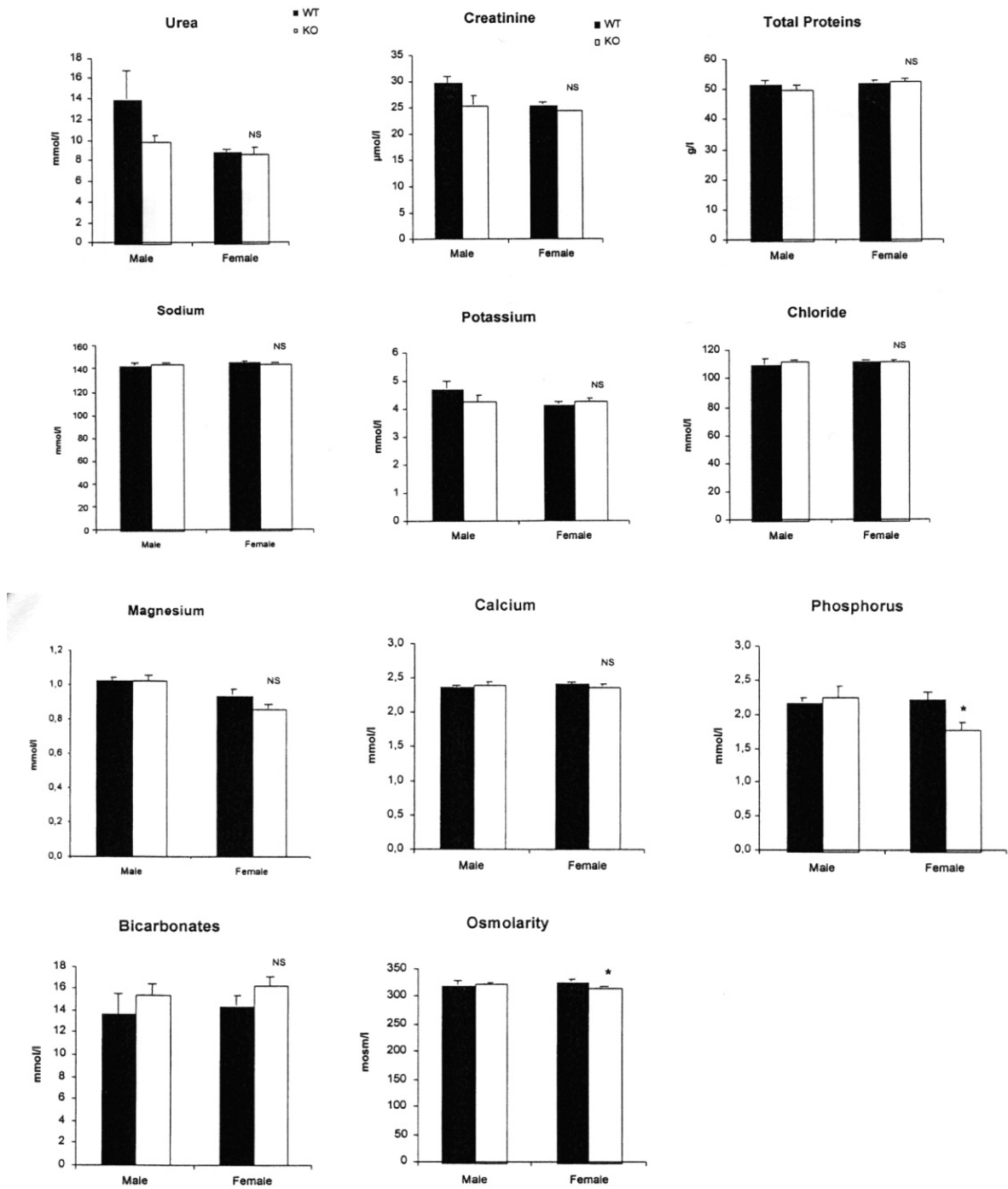


Figure 65 : Analyse sanguine

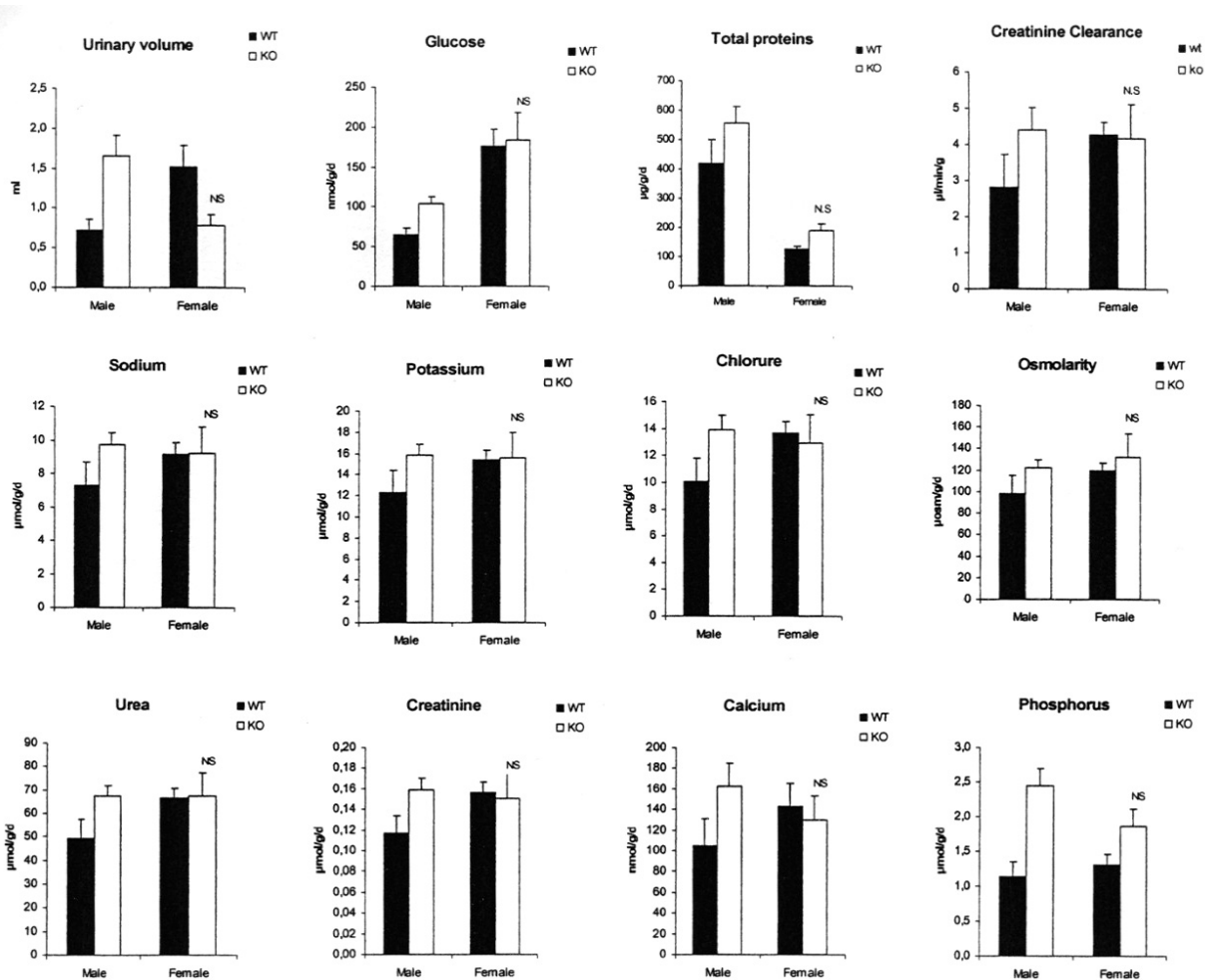


Figure 66 : Analyse urinaire

	K99-6 Males		T-Test	K99-6 Females		T-Test
	WT (n=3)	KO (n=7)	P	WT (n=7)	KO (n=7)	P
SAP (mmHg)	107±4	110±4	ND	102±3	98±6	0.52
HR (bpm)	619±13	620±13	ND	635±21	642±16	0.80

The results are expressed as mean ± SEM. ND: Not determined.

Figure 67 : Mesures de la pression sanguine

Nous pouvons observer une augmentation du volume urinaire, de la concentration de glucose, sodium, potassium et phosphore et une légère protéinurie chez les mâles Luthéran -/- uniquement (figure 66). Les femelles Luthéran -/- ne présentant par contre aucune modification au niveau urinaire par rapport aux souris sauvages, nous avons estimé que les différences observées chez les mâles n'étaient pas considérables. Hormis ces modifications urinaires, les autres paramètres physiologiques ne montrent aucune différence significative entre les souris Luthéran -/- et les souris contrôles.

B. Analyse de la fonction musculaire intestinale

Un épaissement des couches musculaires avait été observé au niveau histologique dans les intestins de souris Luthéran $-/-$. Afin de déterminer la cause de cet épaissement et de savoir si les cellules musculaires lisses intestinales présentait des altérations morphologiques et fonctionnelles, nous avons analysé l'ultrastructure du muscle lisse en microscopie électronique (figure 68), l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation du muscle lisse (figure 69) et réalisé une analyse fonctionnelle par mesure de la vitesse de transit (figure 70).

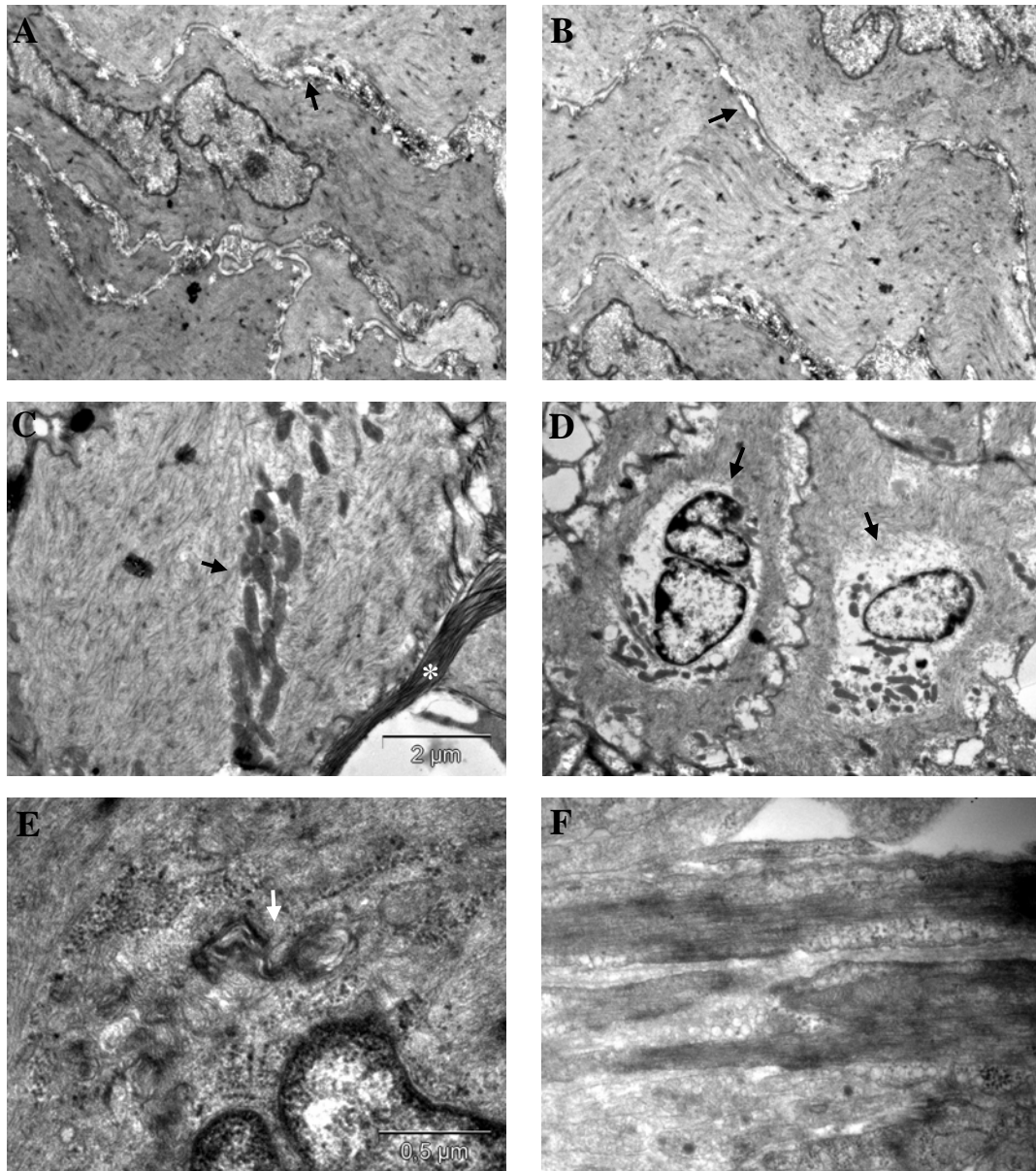


Figure 68 : Analyse ultrastructurale du muscle intestinal des souris Luthéran $-/-$ en microscopie électronique à transmission

Les fibres musculaires et les lames basales entourant les cellules musculaires sont plissées (A et B) et l'on observe très régulièrement une perte d'adhésion des cellules musculaires à la lame basale (flèches en A et B). Les cellules musculaires présentent un regroupement des mitochondries au centre de la cellule (flèche en C) et une accumulation de fibres de collagène entre les cellules (* en C). Certaines cellules musculaires sont en état de mort cellulaire, comme l'atteste la présence de noyaux en nécrose (flèches en D) et la dégénérescence de mitochondries (flèche en E). Une accumulation en abondance de vésicules de pinocytose a également été observée (F).

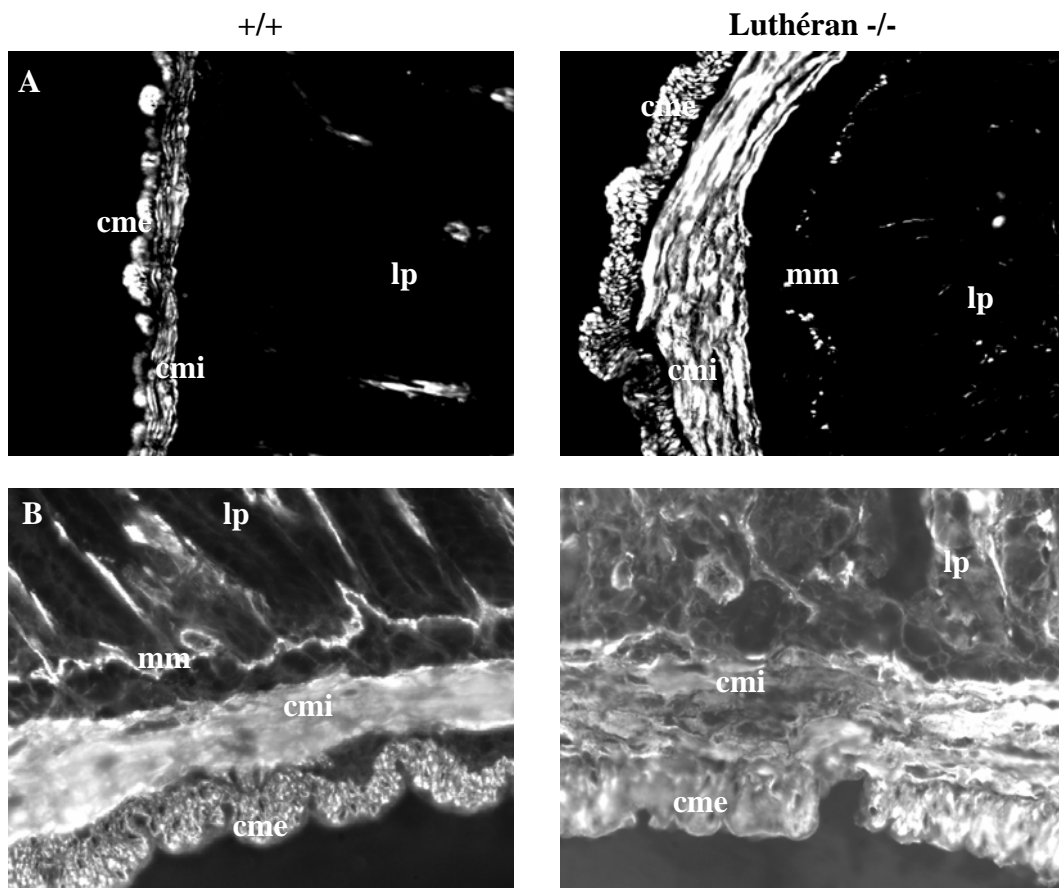


Figure 69 : Immunomarquage de la desmine (A) et de l' α -actine de muscle lisse (B) dans des intestins sauvages et invalidés pour le Luthéran.

Les souris Luthéran $-/-$ ne présentent aucune altération de l'expression de la desmine dans le muscle intestinal. L' α -actine de muscle lisse est également bien exprimée avec toutefois un marquage un peu plus diffus que celui observé dans le muscle intestinal sauvage. cmi : couche musculaire interne, cme : couche musculaire externe, mm : musculaire muqueuse, lp : lamina propria

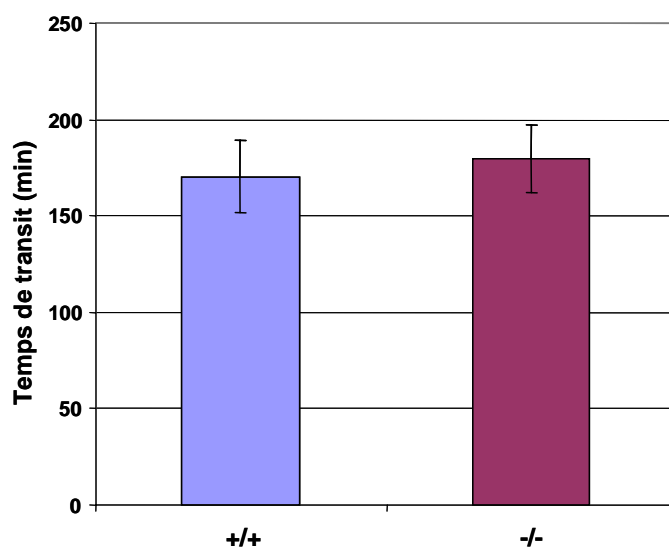


Figure 70 : Analyse de la vitesse de transit intestinal des souris Luthéran $-/-$

Les souris Luthéran $-/-$ ont un temps de transit intestinal équivalent à celui des souris sauvages. La méthode employée est décrite dans la publication 2.

Cette analyse de la fonction musculaire des intestins Luthéran $-/-$ a donc révélé une **altération de l'intégrité tissulaire** mais qui ne semble pas avoir de conséquences fonctionnelles.

Discussion des résultats

V. Discussion des résultats

Le résultat principal de cette étude est que le Luthéran, récepteur de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, est nécessaire au maintien d'une lame basale bien organisée dans le rein et dans l'intestin.

J'ai montré que le Luthéran est fortement exprimé dans l'intestin, à la fois dans le compartiment **épithélial** et dans le compartiment **musculaire**, ceci avec plusieurs anticorps différents, ce qui invalide les résultats de Moulson et al., 2001 qui ne trouvaient aucune expression de la protéine dans l'intestin par Western Blot. Le Luthéran est également très exprimé dans le rein, dans l'endothélium des vaisseaux sanguins et dans bien d'autres organes [pour revues : (Kikkawa et Miner, 2005);(Eyler et Telen, 2006)]. Il est impressionnant que l'abolition d'une telle expression n'aboutisse pas à un phénotype plus flagrant ou à un problème physiologique majeur (publication 1 et figures 62 à 67 des résultats complémentaires). Ce constat est d'autant plus surprenant que le Luthéran est spécifique de la chaîne $\alpha 5$ et qu'il présente une structure bien distincte des autres récepteurs liant cette chaîne, suggérant un rôle à part de cette interaction chaîne $\alpha 5$ /Luthéran et excluant la possibilité d'une compensation de l'absence de Luthéran par un autre récepteur. J'ai écarté cette éventualité en montrant qu'il n'y a pas de sur-expression des intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (non illustré).

L'extinction de l'expression du Luthéran à la base des cellules épithéliales de l'intestin ne compromet ni l'émergence des différents types cellulaires et leur différenciation, ni leur fonctionnalité. En effet, les analyses sanguines des souris Luthéran -/- n'ont révélé aucune carence (figure 65 des résultats complémentaires) et le poids corporel et la masse graisseuse sont tout à fait équivalents à ceux des souris sauvages (figure 62 et 63 des résultats complémentaires), attestant qu'il n'y a pas de problème d'absorption alimentaire.

En revanche, j'ai montré que le Luthéran est impliqué dans l'organisation et **l'intégrité du muscle intestinal**. En effet, l'analyse ultrastructurale a révélé une grande désorganisation du muscle lisse associée à une **perte de contact intercellulaire**, et une altération des cellules musculaires lisses pouvant aboutir à leur **nécrose** (publication 2 et figure 68 des résultats complémentaires). Pourtant, aucun défaut n'a été remarqué au niveau de l'expression de marqueurs du muscle lisse, du moins par immunofluorescence (figure 69 des résultats complémentaires). Ces marqueurs sont peut-être bien exprimés par les cellules mais cela n'exclut pas une possible altération dans l'organisation de ces filaments. Il aurait été par ailleurs intéressant d'analyser l'expression de la spectrine, ligand intracellulaire du Luthéran (Kroviarski et al., 2004;Parson et al., 1995) mais aucun anticorps reconnaissant l'antigène murin n'était disponible.

Cette perte d'intégrité du tissu musculaire de l'intestin ne compromet pas son bon fonctionnement. En effet, les souris invalidées pour le Luthéran ont un transit tout à fait normal, ce qui atteste qu'il n'y a **pas de défaut de motricité intestinale** nécessaire à cette progression du bol alimentaire (publication 2 et figure 70 des résultats complémentaires).

Cela est très étonnant, mais une constatation similaire a été faite pour le rein. Nous avons en effet noté un **épaississement et un bourgeonnement de la lame basale glomérulaire** en absence du récepteur Luthéran. La chaîne $\alpha 5$ de laminine ne semble pas sur-exprimée mais présente un marquage plus diffus, moins organisé que dans les glomérules de souris sauvages, ce qui pourrait expliquer cet élargissement de la lame basale. Dans le rein, la présence du Luthéran semble donc requise pour une architecture correcte de la lame basale glomérulaire. Son épaississement n'empêche pour autant pas une bonne filtration glomérulaire comme l'atteste l'absence de protéinurie massive au niveau de l'analyse des urines des souris Luthéran -/- (figure 66 des résultats complémentaires). L'invalidation du récepteur Luthéran entraîne des altérations rénales tout de même moins sévères que l'invalidation de son ligand exclusif, la chaîne $\alpha 5$ de laminine. Les embryons Lama5 -/- présentent en effet une dysmorphogénèse, voire une agénèse, des reins

associée à une désagrégation de la lame basale (Miner et al., 2000). Le Luthéran ne semble donc pas impliqué dans le développement rénal mais dans le maintien de son intégrité tissulaire. Nous avons vu que l'adhésion des cellules mésangiales à la chaîne $\alpha 5$ est essentielle à la structure des capillaires glomérulaires. Le fait que cette adhésion se fasse majoritairement par l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et seulement secondairement par le Luthéran pourrait expliquer l'absence de conséquences physiologiques suite à la délétion du Luthéran dans le rein.

L'absence de conséquences physiologiques à ces défauts d'intégrité tissulaire est difficilement explicable. Nous avons constaté que l'épaississement du muscle intestinal observé chez les souris Luthéran -/- se résorbe avec le temps (entre 4 et 6 mois) mais pour autant les défauts d'ultrastructure restent présents. L'épaississement ne semble pas avoir une cause inflammatoire, car aucune anomalie n'est ressortie du bilan hématologique (figure 65 des résultats complémentaires) et je n'ai observé aucun infiltrat particulier de cellules immunitaires au niveau histologique. Cet épaississement semble donc être la cause directe de l'incohésion cellulaire du muscle intestinal certainement due à un détachement des cellules de la lame basale musculaire. Cette perte d'adhésion cellulaire est étonnante du fait de la présence d'autres récepteurs de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le muscle [forte expression de la sous-unité $\beta 1$ d'intégrine et expression plus faible des sous-unités $\beta 4$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ en immunofluorescence (données personnelles); l'expression des autres intégrines n'a pas été analysée]. Il semble donc que ces autres récepteurs ne soient pas capables d'assumer cette fonction d'**adhésion des cellules musculaires lisses intestinales à la lame basale**. Peut-être avons-nous ici mis en évidence un rôle spécifique de l'interaction laminine $\alpha 5$ /Luthéran dans le muscle intestinal.

Impact

Ces résultats ont montré que le Luthéran n'a pas de rôle physiologique majeur malgré sa forte expression dans de nombreux tissus. Nous avons mis en évidence son importance pour le maintien de l'intégrité de la lame basale glomérulaire et des lames basales entourant les cellules musculaires lisses intestinales. Le Luthéran est ainsi essentiel à la cohésion tissulaire du rein et du muscle intestinal.

3^{ème} Partie :

**Caractérisation d'anomalies d'expression de la chaîne $\alpha 5$
de laminine dans la maladie de Hirschsprung**

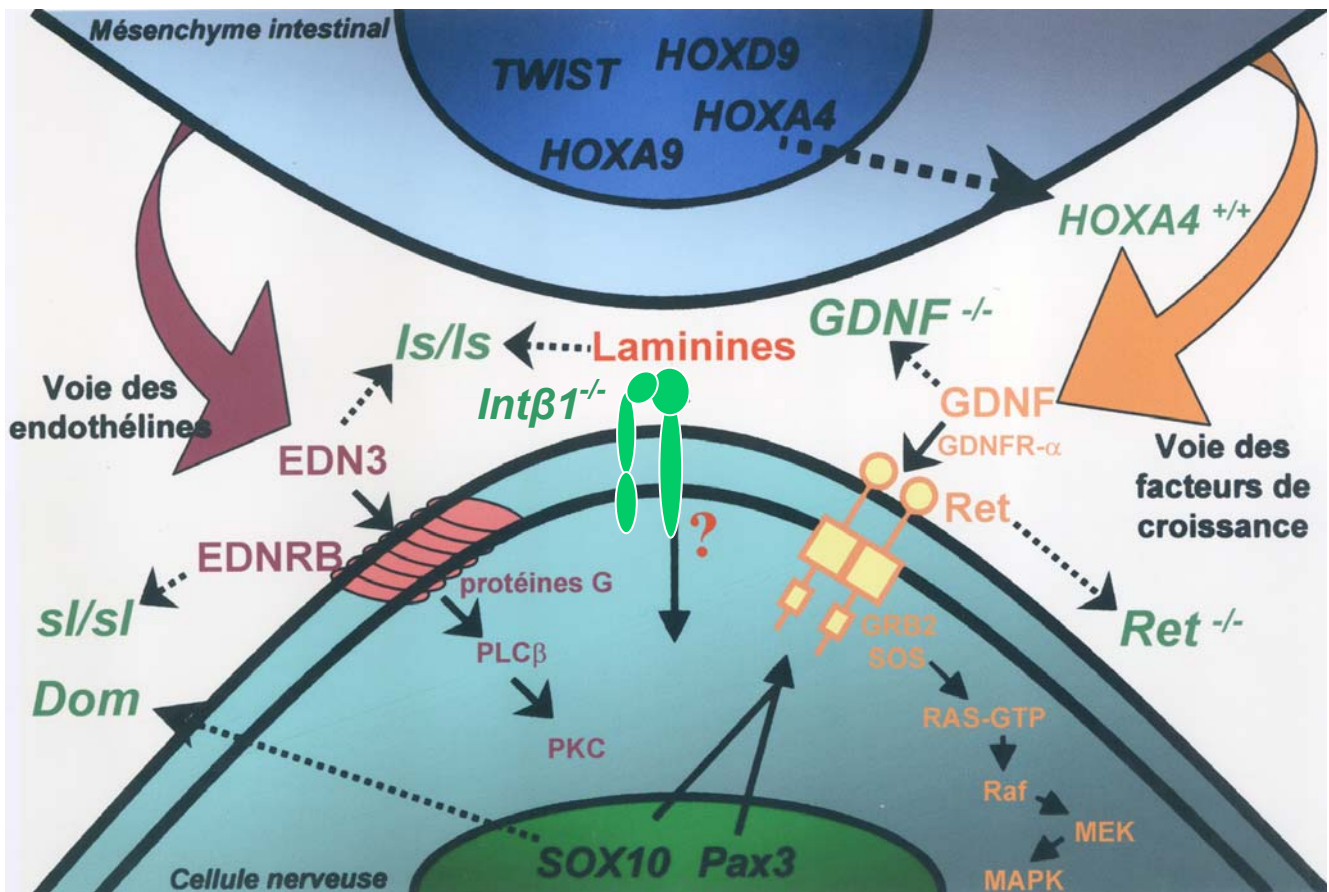


Figure 71 : Représentation des voies de signalisation et des molécules impliquées dans la maladie de Hirschsprung

Les modèles animaux présentant un phénotype de mégacôlon congénital sont indiqués en vert. *Dom* : souris « Dominant mégacôlon » ; *ls/ls* : souris « lethal spotted » ; *sl/sl* : souris « piedbald spotted » ; *Hoxa4+/+* : souris surexprimant *Hoxa4* ; *Intβ1-/-* : souris invalidées pour la sous-unité β1 d'intégrine (Adapté du DEA de A. Neuville, 2000)

Caractérisation d'anomalies d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la maladie de Hirschsprung

I. Base du travail :

La maladie de Hirschsprung ou **mégacôlon congénital** est une anomalie de fonctionnement de la partie terminale de l'intestin caractérisée par une absence **segmentaire** de cellules ganglionnaires parasympathiques des plexus sous-muqueux et myentériques. Elle se manifeste généralement dès les premiers jours de vie par un syndrome d'occlusion intestinale due à l'**absence partielle ou totale de ganglions nerveux**, dont le rôle est de permettre le bon fonctionnement des muscles de l'intestin. Son incidence est environ de 1 cas pour 5000 naissances, représentant ainsi la cause la plus fréquente d'obstruction intestinale d'origine congénitale. Le traitement consiste en une résection chirurgicale du segment déplété en cellules ganglionnaires. La physiopathologie de la maladie de Hirschsprung s'explique soit par un **défaut de migration des cellules de la crête neurale** soit par une anomalie de différenciation de ces cellules au niveau des plexus entériques (Puri et al, 1998). Plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la migration des cellules de la crête neurales ont en effet été trouvés responsables de cette maladie, notamment des mutations du récepteur **RET**, de son ligand **GDNF** ou de **Sox 10** (figure 70). D'autres gènes plutôt impliqués dans la différenciation des cellules de la crête neurale, tels que l'**endothéline-3** (EDN3), son récepteur **EDNR-B** ainsi que le gène **ECE1** codant pour une enzyme activatrice de l'endothéline-3, ont également été trouvés mutés chez des patients porteurs de mégacôlon congénital. Les souris invalidées pour ces différents gènes présentent toutes une **aganglionose intestinale** et peuvent donc servir de modèle pour cette maladie. Il a été intéressant de noter une **accumulation de laminine** au niveau de l'intestin des souris *ls/ls* comportant une mutation spontanée de EDN3 (Rothman et al, 1996). D'autres travaux ont montré qu'il existait des anomalies de distribution des composants de la matrice extra-cellulaire dans la maladie de Hirschsprung, en particulier une accumulation de laminines dans le **muscle lisse colique** (Parikh et al., 1992). Cependant, ce résultat a été obtenu suite à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la plupart des isoformes de laminine, ne permettant pas d'identifier précisément les **isoformes** impliquées.

Nous avons vu dans l'introduction que la chaîne $\alpha 5$ de laminine est impliquée dans la migration des cellules de la crête neurale en ayant un effet non permissif sur leur migration délimitant ainsi leur trajet migratoire. Par ailleurs, les souris *Lama5*^{-/-} montrent un délai de formation des neurones périphériques associé à un retard d'expression de Sox 10 (Coles et al., 2006).

L'objectif de ce travail a été d'analyser les profils d'expression des différentes chaînes de laminines présentes dans le muscle intestinal de patients atteints de maladie de Hirschsprung afin d'identifier clairement quelles sont les isoformes impliquées. Je me suis particulièrement intéressée à l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au vu de sa forte expression dans le muscle intestinal et de sa potentielle implication dans la migration des cellules de la crête neurale laissant présumer qu'une dérégulation pourrait contribuer à une aganglionose intestinale.

II. Résumé des résultats

Ce travail a été réalisé en collaboration avec 3 services hospitaliers : le service de Pédiatrie du Professeur Jaubert à l'hôpital Necker-Paris et les services de Pédiatrie du Professeur Becmeur, et d'Anatomo-pathologie du Professeur Bellocq (avec la participation du Dr A. Neuville) du CHU de Strasbourg-Hautepierre. Ainsi nous avons eu accès à 11 prélèvements intestinaux exploitables (9 cas de maladie de Hirschsprung, 1 cas de maladie de Waardenburg et 1 cas de pseudo-obstruction idiopathique).

Nous avons caractérisé histologiquement et comparativement le segment proximal sain et encore pourvu de plexus et le segment aganglionnaire en aval. L'utilisation d'anticorps anti-synaptophysine et anti-neurofilament nous a permis d'attester de la présence de cellules

neuronales au sein des plexus de la région proximale alors que la région distale en est dépourvue et présente à la place des **fibres nerveuses hypertrophiées et désorganisées**. L'utilisation d'un anticorps anti-S100, marqueur de cellules gliales, nous a permis de révéler une repopulation de ces plexus aganglionnaires par des **cellules de Schwann**. L'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et, comparativement, d'autres isoformes de laminine a ensuite été caractérisée. Nous avons pu mettre en évidence l'existence, dans le segment sain, de lame basale **autour** des deux types de plexus myentériques et sous-muqueux présentant une expression des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\gamma 1$ de laminine. Par contre nous avons détecté un changement du profil d'expression de certaines laminines au sein des plexus de la zone malade aganglionnaire. En effet, une forte expression des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\gamma 1$ a été détectée **à l'intérieur des plexus**, en plus du marquage qui les entoure. Par ailleurs nous avons pu mettre en évidence une **modification du profil d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine** au niveau musculaire entre les zones ganglionnaire et aganglionnaire. En effet, alors que la chaîne $\alpha 5$ présente normalement une forte expression au niveau de la couche musculaire interne et une expression plus faible dans la couche musculaire externe, son expression est similaire dans les deux couches musculaires du segment ganglionnaire dilaté précédant le segment aganglionnaire. Cette sur-expression a été confirmée par RT-PCR (non illustré). L'existence de plexus aganglionnaires pourrait ainsi s'expliquer par le fait que, lors du développement de l'intestin, cette expression excessive de la chaîne $\alpha 5$ dans le mésenchyme empêcherait la migration des cellules de la crête neurale à l'origine des plexus entériques. Une modification similaire du profil d'expression de laminines a été retrouvée dans la maladie de Waardenburg, caractérisée par une aganglionose colique et des problèmes cutanés mais non dans la pseudo-obstruction idiopathique (CIIP, obstruction intestinale sans aganglionose). La modification de l'expression de certaines chaînes de laminine au sein des intestins malades pourrait ainsi servir de **marqueur diagnostique** d'aganglionose intestinale.

Les résultats détaillés sont présentés dans la publication 3 :

- **The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation: L. Ritié^{*}, F. Alpy^{*}, F. Jaubert, F. Becmeur, A. Méchine-Neuville, O. Lefebvre, C. Arnold, L. Sorokin, M. Kedinger and P. Simon-Assmann, Hum. Pathol., 2005, 36:1055-1065. ^{*}premiers co-auteurs – page 179**

Publication 3 :

The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation

The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation

Fabien ALPY, Léa RITIÉ, Francis JAUBERT, François BECMEUR, Agnès MÉCHINE-NEUVILLE, Olivier LEFEBVRE, Christiane ARNOLD, Lydia SOROKIN, Michèle KEDINGER and Patricia SIMON-ASSMANN

Human Pathology , 2005, Vol. 36 , Numéro 10 , Pages 1055 - 1065

Pages 180-190 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.07.013>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Discussion des résultats

IV. Discussion des résultats

Ce travail a permis de caractériser précisément les modifications des laminines dans la maladie de Hirschsprung et de mettre en évidence la présence anormale de cellules de Schwann à la place des cellules neuronales dans les plexus des segments aganglionnaires.

Nous avons en effet identifié la **chaîne $\alpha 5$ de laminine** comme étant la chaîne de laminine surexprimée dans le muscle lisse des intestins touchés par la maladie de Hirschsprung. Cette sur-expression se fait dans le **segment dilaté** précédant le segment aganglionnaire. Des expériences de RT-PCR attestent que cette accumulation a lieu dans la zone de transition hypoganglionnaire (non illustré). Il est par contre étonnant de ne pas avoir observé de modifications de chaînes β ou γ accompagnant celle de la chaîne $\alpha 5$. Le fait que ces chaînes s'associent également à d'autres chaînes α ne permet peut-être pas de voir leur éventuelle différence d'expression. Cette absence de modification peut aussi suggérer que la chaîne $\alpha 5$ pourrait être sécrétée sous forme de monomère. L'accumulation de chaîne $\alpha 5$ en amont du segment malade que nous avons mis en évidence ne corrèle pas avec les résultats obtenus par Parikh et al. (1992a) qui ont révélé par immunoadsorption sur phase solide une quantité de laminine (toutes isoformes confondues) supérieure dans le segment aganglionnaire par rapport au segment sain correspondant. Nous n'avons pourtant détecté aucune modification notable d'autres laminines entre les segments ganglionnaire et aganglionnaire chez un même patient qui aurait pu expliquer cette différence de résultats. L'accumulation de chaîne $\alpha 5$ dans le muscle ne semble pas être due à la dilatation du segment en amont de la zone malade liée à l'obstruction intestinale, car cette accumulation n'est pas observée dans les cas de CIIP (chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction). Cette accumulation dans la couche circulaire externe n'est pas liée à des modifications des marqueurs du muscle lisse.

Nous avons vu précédemment que 2 hypothèses tentent d'expliquer la cause de la maladie de Hirschsprung : la première serait un défaut de migration des cellules de la crête neurale et la seconde un défaut de leur différenciation au sein des plexus entériques.

Par cette étude, nous avons caractérisé les plexus aganglionnaires d'un point de vue histologique et cytologique. La première chose à prendre en considération est que des plexus, certes anormaux, sont présents dans le segment malade malgré l'absence de cellules neuronales et contiennent quelques cellules gliales (observées sur coupes histologiques d'après leur morphologie). Nous avons démontré la présence de **cellules de Schwann** au sein de ces plexus. 3 critères nous ont permis de les identifier: leur morphologie caractéristique, un immunomarquage S100 positif (marqueur commun aux cellules gliales et aux cellules de Schwann) et la présence de chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ autour de ces cellules [Patton (2000) a en effet démontré que ces chaînes sont spécifiquement déposées autour des cellules de Schwann].

La présence de plexus peuplés de cellules gliales et de cellules de Schwann au sein de la zone aganglionnaire, et le fait que ces deux types cellulaires dérivent des cellules de la crête neurale (Mirsky et Jessen, 1996) nous permet d'appuyer l'hypothèse d'un **défaut de cytodifférenciation des cellules de la crête neurale** au sein du mésenchyme de l'intestin distal en défaveur de l'hypothèse d'un défaut de migration et de non population de cette région par ces cellules. Il s'agirait plutôt de l'induction d'un mauvais lignage lors de la différenciation des cellules de la crête neurale ayant bien colonisé les plexus de cette zone malade. Ce défaut de cytodifférenciation pourrait être attribué à des mutations de gènes exprimés par le mésenchyme comme ceux intervenant dans la voie de l'endothéline-3 ou ceux de la famille des gènes Hox. A noter que les souris surexprimant Hoxa4 présentent une aganglionose (Wolgemuth et al., 1989) et que l'expression du gène HoxA9 est augmentée dans les intestins atteints de maladie de Hirschsprung (DEA de A. Neuville 2000, et données personnelles, non illustré).

Je ne remets pour autant pas en cause l'hypothèse évoquée dans la publication qui dit que l'accumulation de chaîne $\alpha 5$ que nous avons observée dans le segment ganglionnaire précédant la zone malade empêcherait la **migration** des cellules de la crête neurale vers les zones en aval et que la présence de cellules de Schwann résulterait d'une repopulation des plexus entériques à partir du système nerveux périphérique. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Coles et al. (2006) qui ont suggéré que la chaîne $\alpha 5$ a un effet non permissif sur cette migration délimitant les voies migratoires. De plus, il a été démontré qu'un des récepteurs majeurs de la chaîne $\alpha 5$, l'intégrine $\beta 1$, est nécessaire pour la complète migration des cellules de la crête neurale pour la colonisation de l'intestin distal chez la souris et que son invalidation génique spécifiquement dans les cellules de la crête neurale entraîne un phénotype intestinal de type maladie de Hirschsprung (Breau et al, 2006). Mais l'absence d'intégrine $\beta 1$ n'inhibe pas totalement la migration de ces cellules et une colonisation partielle de l'intestin a tout de même lieu. De la même façon, on peut penser que cette accumulation de chaîne $\alpha 5$ dans la maladie de Hirschsprung empêche la migration des cellules de la crête neurale vers le segment aganglionnaire mais seulement de façon **partielle**.

Les plexus anormaux de la zone aganglionnaire pourraient donc être le résultat à la fois d'un défaut migratoire et d'un défaut de cytodifférenciation des cellules qui ont réussi à atteindre l'intestin distal.

Impact

Par cette étude, nous avons mis en évidence une nouvelle caractéristique des cas d'aganglionose qui est la présence anormale de cellules de Schwann au sein des plexus entériques.

Nous avons révélé une accumulation de chaîne $\alpha 5$ de laminine au sein du muscle lisse des intestins malades, ce qui appuie l'importance du microenvironnement cellulaire dans la maladie de Hirschsprung.

La modification de l'expression de certaines laminines que nous avons mis en évidence au sein des plexus de zone aganglionnaire pourra être utilisée comme marqueur diagnostique de la maladie de Hirschsprung.

4^{ème} Partie :

**Analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine
dans les carcinomes coliques**

T	tumeur
Tx	ne peut être classée
T0	pas de tumeur primaire retrouvée (en cas de traitement préopératoire par exemple)
Tis	Carcinome in situ (intra-épithélial ou envahissant la lamina propria)
T1	Envahissement de la sous-muqueuse
T2	Envahissement de la musculature
T3	Envahissement de la séreuse ou de la sous-séreuse
T4	Envahissement du péritoine ou d'organes/structures adjacents
Nx	ne peut être classé
N0	pas de ganglions envahis
N1	1 à 3 ganglions envahis
N2	4 ou plus ganglions envahis
Mx	ne peut être classé
M1	pas de métastase
M2	métastases

Tableau IV : Classification TNM pour l'évaluation du stade tumoral

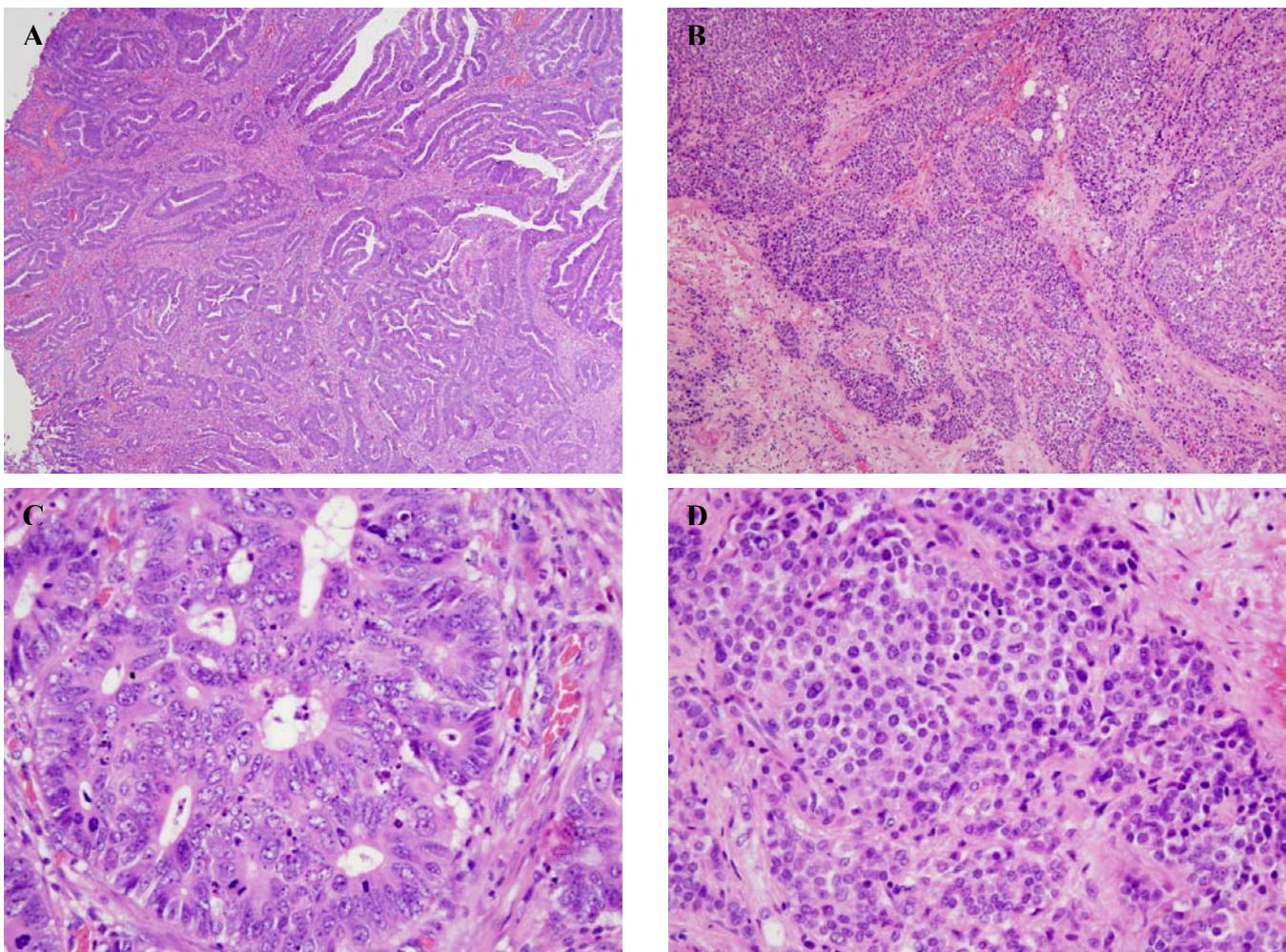


Figure 72 : Histologie d'un adénocarcinome commun bien différencié grade 1 (A et C) et d'un adénocarcinome indifférencié de grade 4 (B et D)

Analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les carcinomes coliques

I. Introduction sur les cancers colorectaux et base du travail

Les cancers colorectaux (CCR) constituent un problème majeur de Santé Publique. En 2000, le nombre annuel de nouveaux cas de cancer colorectal en France était estimé à 36000 nouveaux cas par an et ce cancer représente la 2^{ème} cause de mortalité. D'après les estimations, il devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45000 nouveaux cas en 2020. Près de 16000 personnes décèdent chaque année de cette pathologie qui représente 15% des cancers. Le risque individuel de développer un cancer colorectal est de 5% dans les pays industrialisés et l'Alsace fait malheureusement partie des régions de France les plus touchées.

Les **adénocarcinomes** (origine épithéliale) représentent plus de 95% des cas. Ils se développent progressivement à partir d'un adénome (lésion précancéreuse correspondant à une prolifération intra-épithéliale de cellules néoplasiques). Le risque de transformation cancéreuse de l'adénome augmente avec la taille et le degré de dysplasie. 25 à 30 % des adénomes se transforment en cancer (adénocarcinome). Lorsque la prolifération cellulaire reste intra-épithéliale ou dépasse la lame basale pour envahir la muqueuse, le cancer est dit *in situ*. Lorsque les cellules tumorales dépassent la musculaire muqueuse et envahissent la sous-muqueuse (présence de canaux lymphatiques), le cancer est dit **invasif**.

L'évaluation du **stade** de développement de la tumeur se fait communément selon le **classification TNM** à partir de l'observation histologique de pièces opératoires. Elle repose sur la détermination de l'**extension en profondeur** de la tumeur dans et au-delà de la paroi digestive. Elle prend en compte l'étendue de la tumeur (T), l'invasion des ganglions lymphatiques à proximité de la tumeur (N), et la présence de métastases (M) (Tableau 1).

Le **grade** tumoral correspond au **degré de dysplasie** et à l'**état de différenciation** de la tumeur. Un adénocarcinome commun de grade 1 est une tumeur bien différenciée dont plus de 95% du tissu est composé de glandes coliques. Le grade 2 correspond à une tumeur moyennement différenciée dont 50 à 95% est composées de glandes, le grade 3 à une tumeur peu différenciée avec 5 à 50% de glandes. Un adénocarcinome est dit indifférencié de grade 4, lorsque moins de 5% du tissu tumoral est composé de glandes (figure 72).

Le traitement du CCR consiste en une ablation chirurgicale accompagnée ou non, selon le stade tumoral, d'une chimiothérapie qui peut associer du 5-fluorouracile, de l'acide folinique, de l'irinotécan, inhibiteur de topoisomérase, et de l'oxaliplatine (inhibiteur de la réplication de l'ADN). Un inhibiteur du VEGF, anti-angiogénique (Bevacizumab) et un inhibiteur de l'EGF (Cetuximab) peuvent venir compléter le traitement pour une thérapie plus ciblée.

L'étude des altérations génétiques du CCR a permis d'identifier au moins 2 phénotypes de cancers colorectaux :

-le phénotype **LOH** (Loss Of Hétérozygosity) ou **CIN** (Chromosomal INstability) qui correspond à une **instabilité chromosomique** avec perte ou amplification allélique (85% des CCR) qui touche fréquemment les chromosomes 5q, 17p, 18q et 20q.

-le phénotype **RER** (Replication ERror) ou **MIN** (Miscrosatellite INstability) qui correspond à une **instabilité de microsatellites** due à une **altération des enzymes de réparation** de l'ADN (15% des CCR).

Les CCR se classent en deux catégories :

- les **cancers héréditaires** comprenant :

- la Polypose Adénomateuse Familiale (FAP) associée à une mutation du gène APC (Kinzler et Vogelstein, 1996)
- le syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) également connu sous le nom de syndrome de LYNCH, associé à une mutation de gènes impliqués dans le complexe de réparation des mésappariements de l'ADN (le plus fréquemment hMSH2 et hMLH1)

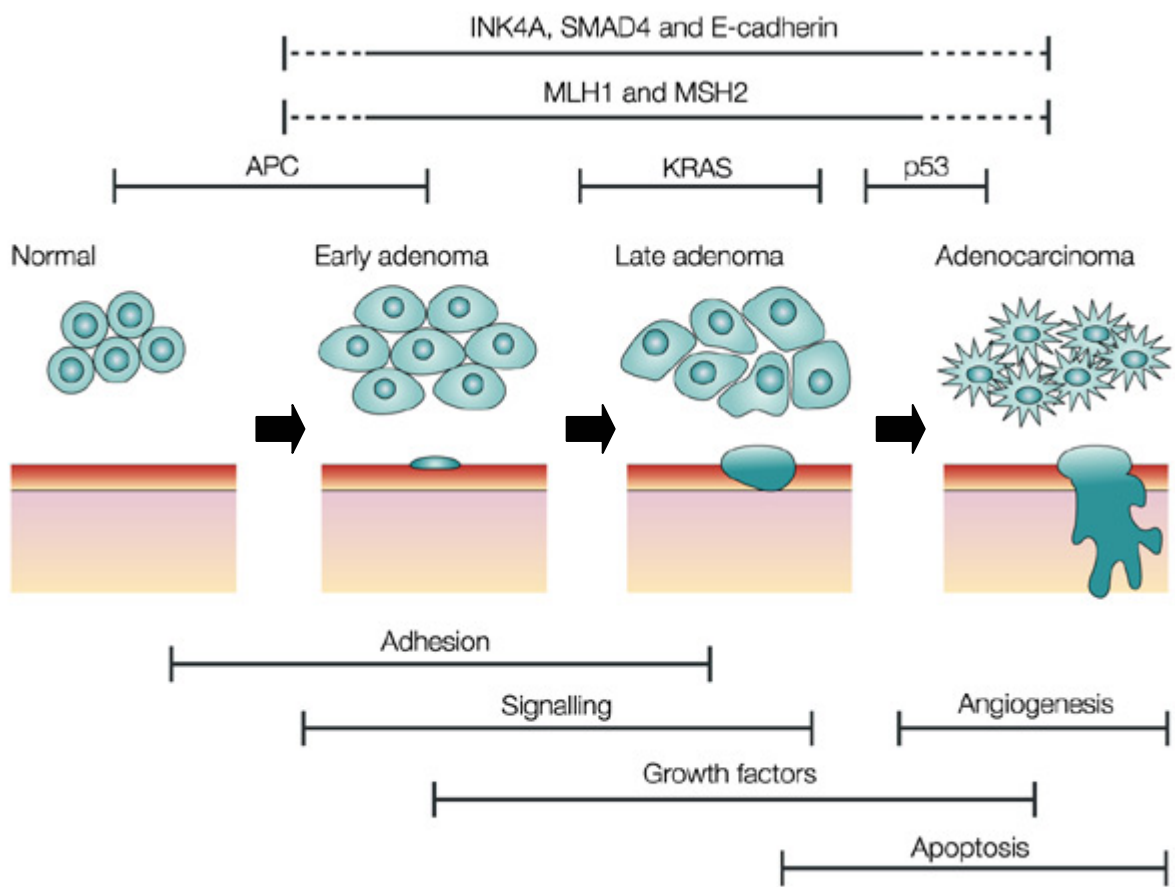


Figure 73 : Evènements moléculaires qui caractérisent l'apparition de l'adénocarcinome colique (Kerr, 2003)

- le syndrome de polypose juvénile associé à des mutations de gènes de la signalisation des BMP (Smad4, BMP-R1a) (Sancho et al., 2004)
- le syndrome de Peutz-Jeghers associé à une mutation du gène LKB1/STK1 codant pour une sérine thréonine kinase activatrice de l'apoptose p-53 dépendante (Baas et al., 2004)

- Les cancers sporadiques, **non héréditaires**, qui représentent environ **95% des cas** et sont le fait d'une **accumulation de mutations** successives (selon le modèle classique de Fearon et Vogelstein, 1990).

En effet, au cours de la transformation maligne, les cellules cancéreuses accumulent des altérations génétiques, mutations, amplifications ou délétions qui modifient les mécanismes du contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Fodde et al., 2002). Une séquence d'évènements moléculaires conduit à la transition d'un épithélium colique normal à l'adénocarcinome (figure 73). La mutation du gène suppresseur de tumeur **APC**, dans 85% des CCR, a pour conséquence la translocation de la β -caténine dans le noyau induisant notamment l'expression du proto-oncogène c-myc, activateur de la mitose et lié au programme spécifique du renouvellement des cellules souches de l'épithélium intestinal normal. Cette délocalisation nucléaire de la β -caténine est également corrélée à l'invasion tumorale (pour revue, Gregorieff et al., 2005). La mutation activatrice de l'oncogène **K-ras**, GTPase contrôlant le cycle cellulaire apparaît dans 50 à 60% des cas de tumorigenèse colorectale. Des gènes de la voie du TGF β sont également souvent altérés : il s'agit du récepteur **TGFBR2**, de **SMAD2** et **SMAD4**. Finalement des mutations de **p53** apparaissent comme des évènements plus tardifs conférant aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose.

La progression tumorale dépend également de protéines impliquées dans la **transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT) nécessaire à la migration des cellules cancéreuses. L'EMT est dépendante de l'**E-cadhérine**, glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire pour l'adhésion cellule-cellule. Une perte de fonction de l'E-cadhérine est trouvée dans divers carcinomes humains (Larue and Bellacosa, 2005). Cette répression de l'E-cadhérine s'explique en partie par une activation d'**Akt**. Il a en effet été montré que l'activation d'Akt réprime l'expression de l'ARNm de la E-cadhérine et est corrélée à une sur-expression de SNAIL également répresseur de la transcription de la E-cadhérine (Grille et al., 2003). Lors de l'EMT, les cellules épithéliales exprimant une forme constitutivement active d'Akt acquièrent une morphologie fibroblastique en montrant une perte d'adhésion cellule-cellule et une augmentation de motilité (Grille et al., 2003). De plus, Akt2 est connu pour être surexprimé et activé dans de nombreux carcinomes humains et notamment dans le **cancer du côlon** (Roy et al., 2002 ; Xu et al., 2004). Cette activation est attribuée en partie à des mutations des gènes PIK3CA (mutation activatrice) et PTEN ou à la stimulation paracrine accrue de certains récepteurs tyrosine kinases. Cette surexpression et suractivation d'Akt peuvent largement contribuer à la tumorigenèse du fait que Akt est impliqué dans de nombreux autres processus associés au cancer. A titre d'exemple, Akt peut inhiber p53 via l'activation de Mdm2, inhiber p21, p27, Bad et la pro-caspase 9 (figure 39), induisant non seulement une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs mais également une inactivation des facteurs pro-apoptotiques. La suractivation d'Akt peut aussi entraîner une activité télomérase accrue conférant un potentiel de réplication à l'infini. Akt est encore un inducteur potentiel de l'angiogénèse tumorale par l'activation d'eNOS. Enfin Akt est connu pour inhiber l'anoikis et pour stimuler la sécrétion de métalloprotéases matricielles, deux phénomènes nécessaires à l'invasion tumorale (Vara et al., 2004).

Mes travaux de doctorat ont montré que, dans l'intestin, la laminine-511 régule les voies de signalisation Wnt et PI3K/Akt qui sont connues pour être impliquées dans la tumorigenèse et la progression tumorale. Une dérégulation de la laminine-511 pourrait modifier l'induction de ces 2 voies de signalisation et participer à la tumorigenèse colique. Ce concept est étayé par les résultats de Määttä et al (2001) démontrant une expression relativement forte de chaîne $\alpha 5$ dans les tumeurs colo-rectales mais variable d'une tumeur à l'autre (6 cas ont été analysés). D'autre

part, la sur-expression *in vitro* de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans des cellules humaines cancéreuses coliques s'accompagne de l'accumulation de chaîne $\alpha 5$, phénomènes s'accompagnant d'une augmentation de la pousse tumorale (De Arcangelis et al., 2001).

Aussi j'ai entamé une analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine au sein de prélèvements de carcinomes coliques afin de déterminer si cette molécule du microenvironnement tumoral y est dérégulée ; la finalité étant de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'expression de la chaîne $\alpha 5$ et l'expression/activation des voies Wnt et Akt.

Patients	MIN	Envahissement	Ganglions envahis	stade
1	-	chorion	0/12	TisN0M0
2	-	sous-muqueuse	0/13	T1N0M0
3	-	muscleuse externe	0/34	T2N0M0
4	-	muscleuse externe	0/14	T2N0M0
5	NR	muscleuse	0/2	T2N0M0
6	NR	muscleuse	2/4	T2N1M0
7	NR	tissu adipeux sous-séreux	0/4	T3N0M0
8	-	tissu adipeux sous-séreux	0/36	T3N0M0
9	-	sous-séreuse	0/42	T3N0M0
10	NR	tissu adipeux	0/5	T3N0M0
11	NR	tissu adipeux sous-séreux	2/12	T3N1M0
12	+	sous-séreuse	2/23	T3N1M0
13	NR	tissu adipeux sous-séreux	2/3	T3N1M0
14	NR	tissu adipeux sous-séreux	3/5	T3N1M0
15	-	tissu adipeux sous-séreux	18/60	T4N2M1

Tableau V : Echantillons de tumeurs colorectales analysés

Les patients ont été classés selon le stade de leur tumeur colorectale. NR : non renseigné

II. Résultats

Analyse de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine par immunofluorescence dans les tumeurs colorectales.

L'étude a porté sur 15 tumeurs colorectales et leurs tissus sains associés (Tableau V). Les tissus sains correspondent à un segment de l'intestin d'un même patient pris à distance de la tumeur et qui ne présentent pas de néoplasie. L'expression de la chaîne $\alpha 5$ a été analysée par immunofluorescence sur des coupes cryogéniques de tumeurs et de tissus sains de façon à comparer les intensités et les profils d'expression.

A. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome *in situ* (stade TisN0M0) (Figure 74)

La tumeur *in situ* présente une grande hétérogénéité de marquage au niveau des glandes coliques tumorales. Certaines ne présentent pas de différence d'expression de la chaîne $\alpha 5$ par rapport au tissu sain (B *versus* A). On retrouve le gradient classique d'expression avec une forte intensité au sommet des glandes (indiqué par les flèches) qui décroît vers le fond des glandes. D'autres glandes présentent un marquage héli-périphérique avec seulement la moitié de la circonférence de la glande exprimant la chaîne $\alpha 5$ (flèche en C) alors que cette expression s'est éteinte dans l'autre moitié (tête de flèche en C). D'autres glandes sont totalement négatives pour l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (tête de flèche en D). Cela n'est pas le fait de glandes isolées ; il s'agit en fait de zone d'extinction où toutes les glandes n'expriment pas la chaîne $\alpha 5$ (E). L'efficacité de l'immunorévélation est prouvée par le marquage des vaisseaux (astérisques en C-E)

B. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant la sous-muqueuse (stade T1N0M0) (Figure 75)

L'expression de la chaîne $\alpha 5$ est maintenue tout le long des glandes de la tumeur de façon plus intense et plus homogène que celle du tissu sain (flèches en B *versus* A). Cette expression est conservée tant que la dysplasie reste bien glandulaire malgré le développement de glandes très étirées et ramifiées (flèche en C). Par contre lorsque la structure glandulaire commence à s'altérer, on observe des pertes d'expression de la chaîne $\alpha 5$ qui semblent refléter une discontinuité de la lame basale (tête de flèche en D). Une perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine semble donc être corrélée à la dédifférenciation de l'adénocarcinome colique.

C. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les adénocarcinomes envahissant la musculuse (stades T2N0M0 et T2N1M0) (Figure 76)

Les 4 cas analysés présentent les mêmes caractéristiques quant à l'expression de la chaîne $\alpha 5$, à savoir : une chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$ est observée à la surface des glandes effaçant ainsi le gradient d'expression classiquement observé dans le tissu sain (flèches en B *versus* A). Par contre ce marquage est maintenu tout le long des glandes alors que ce n'est pas le cas dans le tissu sain (flèche en C *versus* A). Comme précédemment, des discontinuités d'expression de la chaîne $\alpha 5$ apparaissent parallèlement à l'aggravation dysplasique (têtes de flèche en D), jusqu'à une perte quasi-totale d'expression (E).

D. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les adénocarcinomes envahissant la séreuse (stades T3N0M0 et T3N1M0) (Figure 77)

Les 8 échantillons de tumeur de stade T3 montrent une forte expression de la chaîne $\alpha 5$ tout le long des glandes tumorales alors que ce n'est le cas qu'à la surface des glandes au niveau du tissu sain (flèches en B *versus* A). Les zones tumorales plus désorganisées présentent un marquage plus diffus avec une fuite de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans le stroma (disques en C). Dans les zones encore plus indifférenciées, le marquage au niveau des glandes résiduelles devient discontinu reflétant des cassures de la lame basale (têtes de flèches en D), et finit pas s'effacer totalement (têtes de flèche en E, l'astérisque montre l'expression de la chaîne $\alpha 5$ autour des vaisseaux sanguins).

E. Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant le péritoine (stade T4N2M1) (Figure 78)

La tumeur métastatique présente une perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine (C-E *versus* A, B ; les astérisques montrent un marquage des vaisseaux qui prouve l'efficacité de l'immunofluorescence). Le tissu tumoral est très désorganisé et semble très peu différencié (peu de structures glandulaires visibles). La perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$ semble ainsi être corrélée avec la dédifférenciation tumorale.

En conclusion, au sein des tumeurs analysées, le profil d'expression de la chaîne $\alpha 5$ est modifié par rapport aux tissus sains. Les adénocarcinomes présentent en effet une forte expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine au niveau des glandes coliques tumorales dans les zones encore bien structurées. Cette expression est maintenue tout le long des glandes à la différence du gradient classique d'expression, suggérant un rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans le développement tumoral dans les zones encore bien différenciées. Dans les zones plus désorganisées, en cours de dédifférenciation, l'expression de la chaîne $\alpha 5$ est progressivement perdue, induisant certainement une rupture de la lame basale, permettant la dissémination des cellules tumorales. On retrouve cette différence d'expression entre les zones bien différenciées et les zones différenciées quelque soit le stade tumoral, excepté dans les tumeurs très invasives et peu différenciées qui présentent une perte presque totale d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine qui semble parallèle à l'invasion tumorale.

Stade tumoral TisN0M0

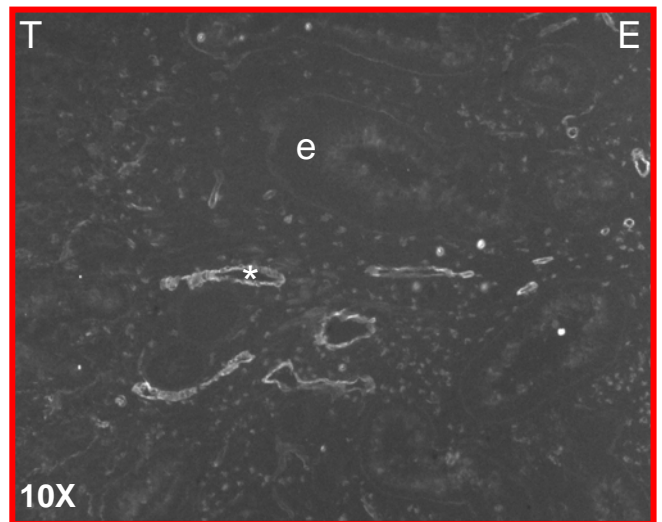
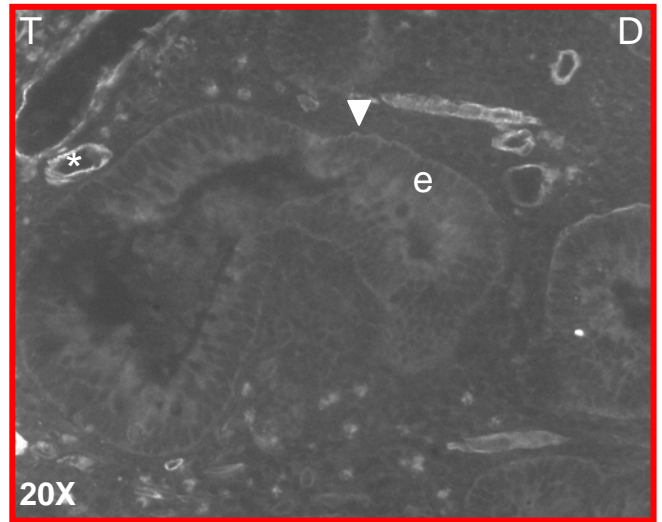
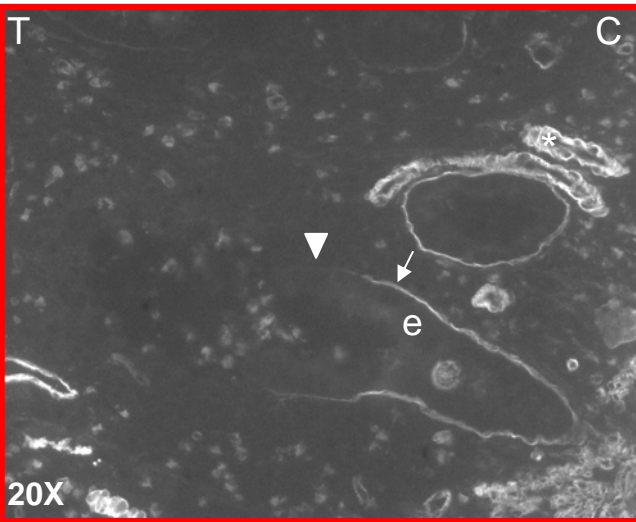
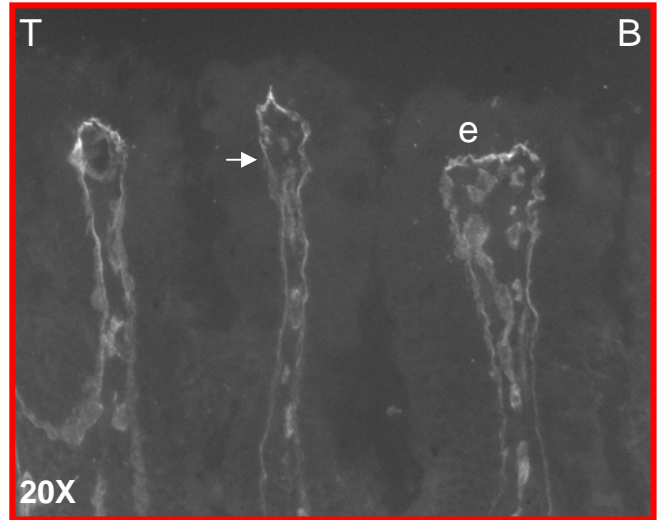
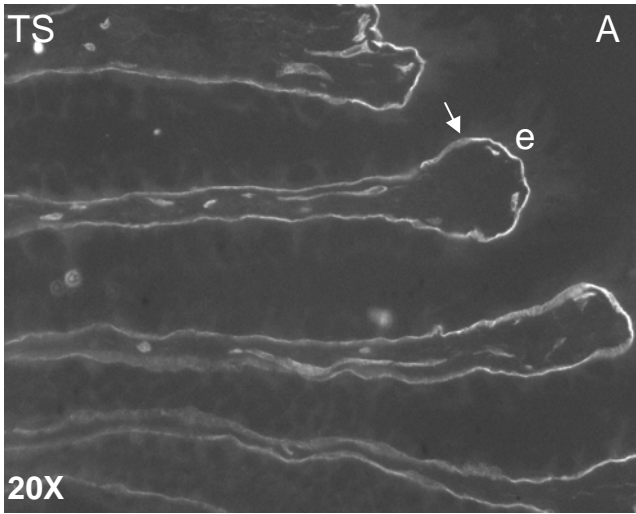


Figure 74 : Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans une tumeur colique *in situ* TisN0M0 (T: B-E)

TS: tissu sain; T: tumeur (encadré rouge); e: épithélium

Les flèches blanches montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales glandulaires.

Les têtes de flèches montrent la perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$.

L'astérisque montre l'expression de la chaîne $\alpha 5$ autour des vaisseaux sanguins.

Stade tumoral T1N0M0

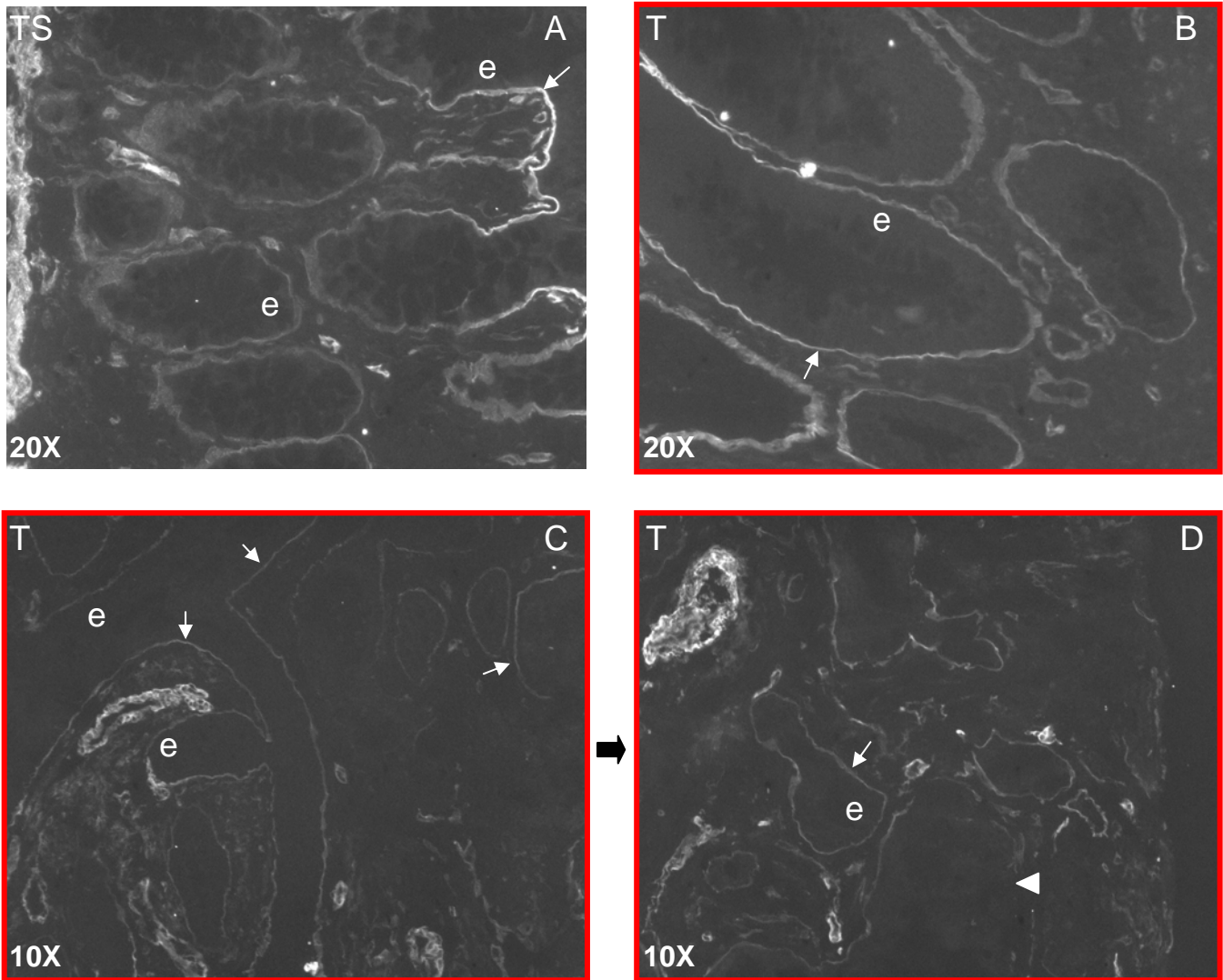


Figure 75: Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant la sous-muqueuse T1N0M0 (T: B-D)

TS: tissu sain; T: tumeur (encadré rouge); e: épithélium

Les flèches blanches montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales glandulaires.

Les têtes de flèches montrent la perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$.

La flèche noire représente l'aggravation de la désorganisation néoplasique au sein de la même tumeur.

Stade tumoral T2N0M0/T2N1M0

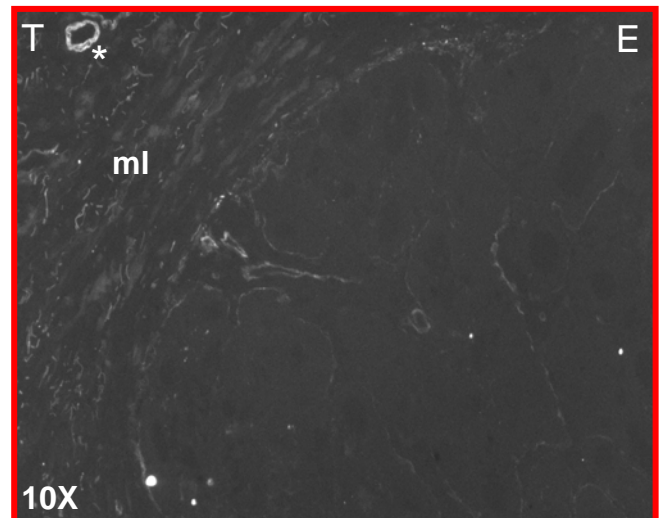
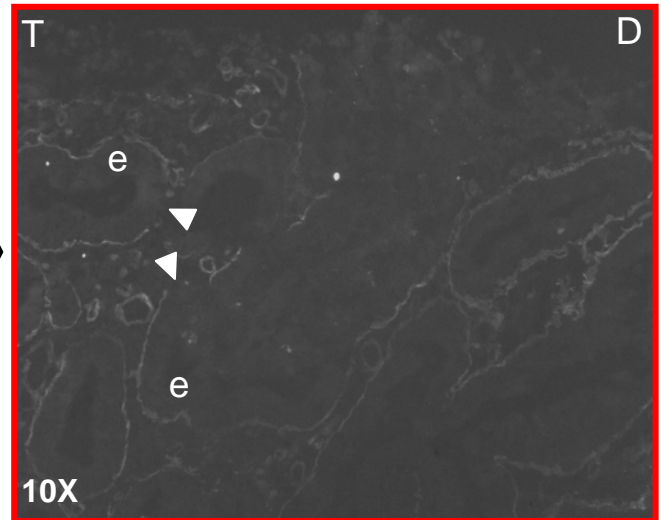
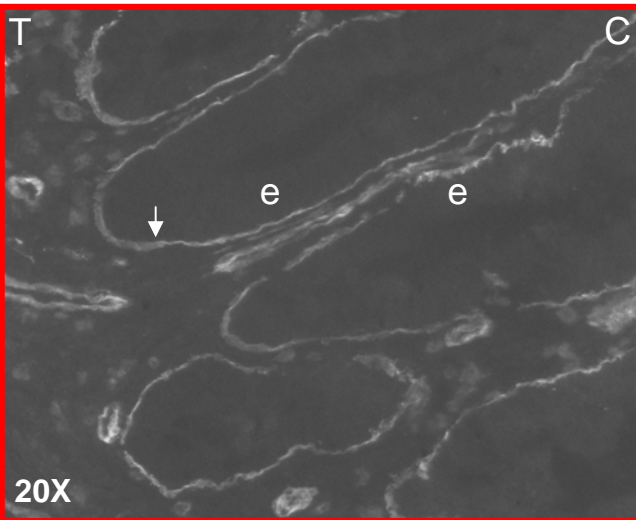
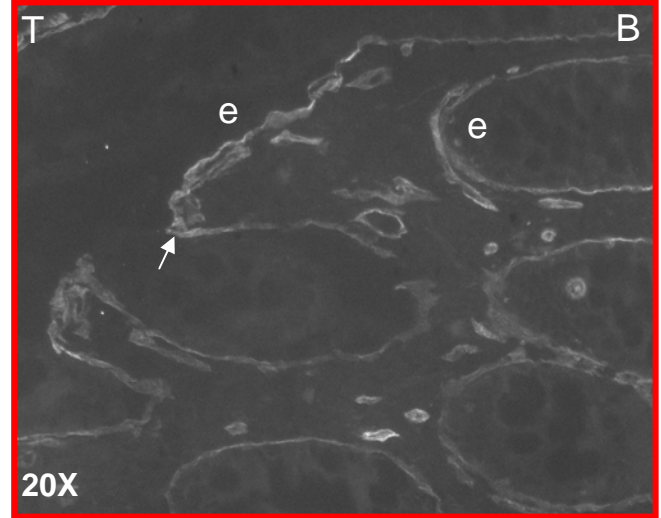
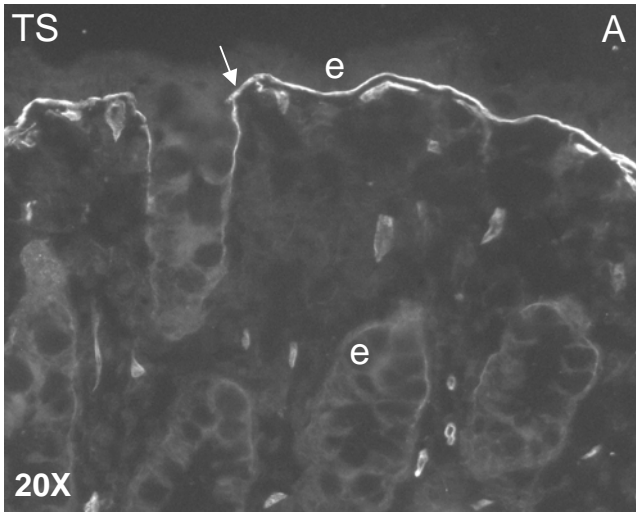


Figure 76: Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant la musculature T2N0M0 ou T2N1M0 (T: B-E)

TS: tissu sain; T: tumeur (encadré rouge); ml: fibres musculaires lisses; e: épithélium

Les flèches blanches montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales glandulaires.

Les têtes de flèches montrent la perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$.

L'astérisque montre l'expression de la chaîne $\alpha 5$ autour des vaisseaux sanguins

Les flèches noires représentent l'aggravation de la désorganisation néoplasique au sein d'une même tumeur.

Stade tumoral T3N0M0/T3N1M0

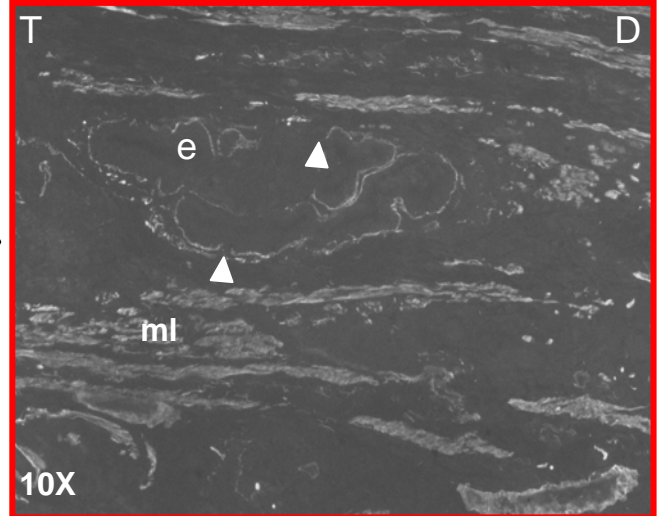
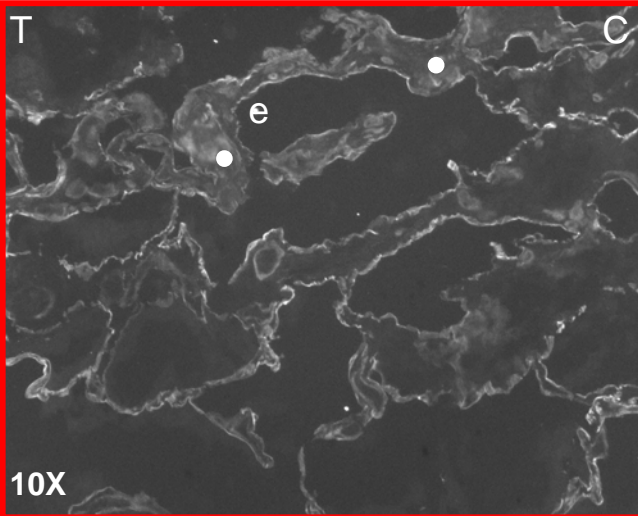
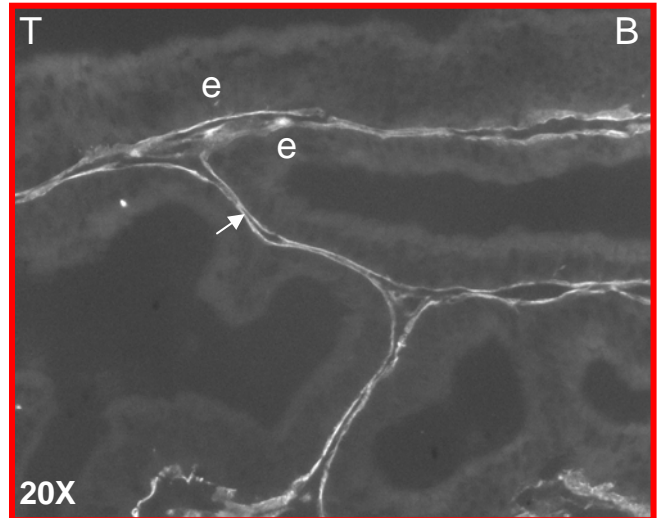
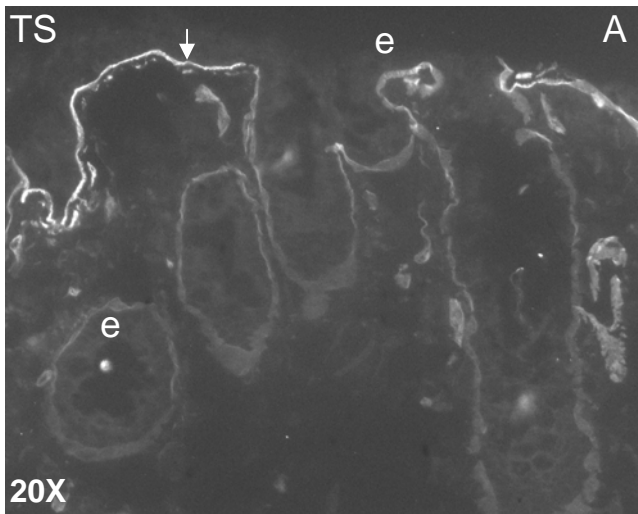


Figure 77 : Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant la séreuse T3N0M0 ou T3N1M0 (T: B-E))

TS: tissu sain; T: tumeur (encadré rouge); e: épithélium; ml: fibres musculaires lisses

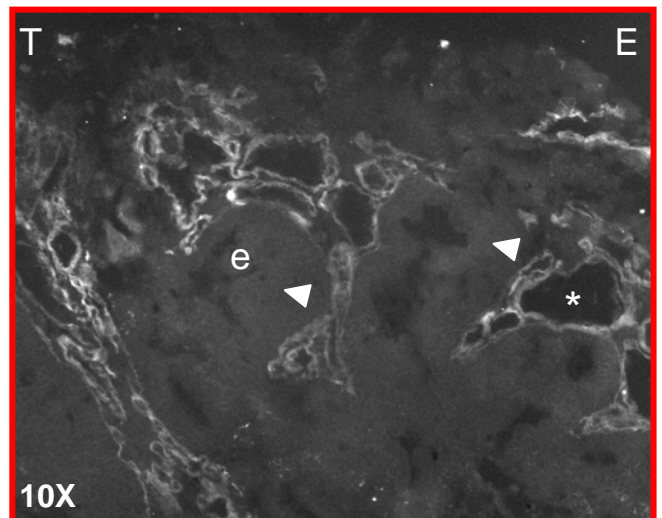
Les flèches blanches montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales glandulaires.

Les têtes de flèches montrent la perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$.

Les disques blancs montre une expression stromale de la chaîne $\alpha 5$.

L'astérisque montre l'expression de la chaîne $\alpha 5$ autour des vaisseaux sanguins.

Les flèches noires représentent l'aggravation de la désorganisation néoplasique au sein de la même tumeur.



Stade tumoral T4N2M1

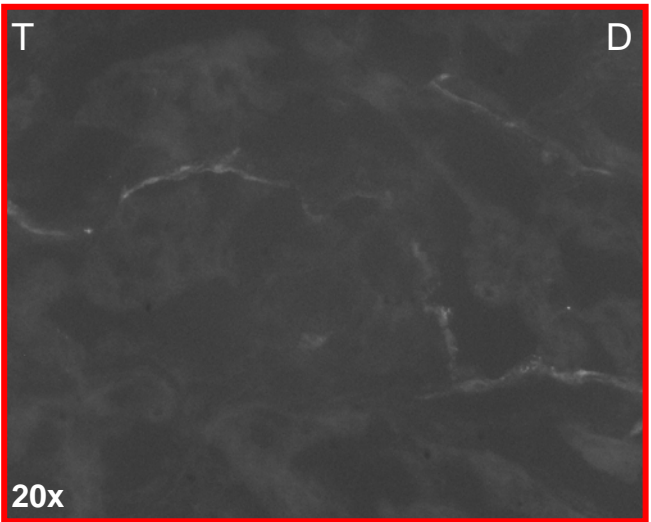
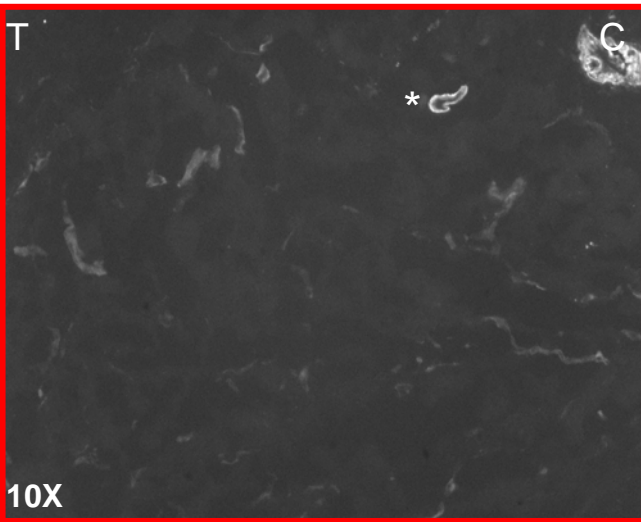
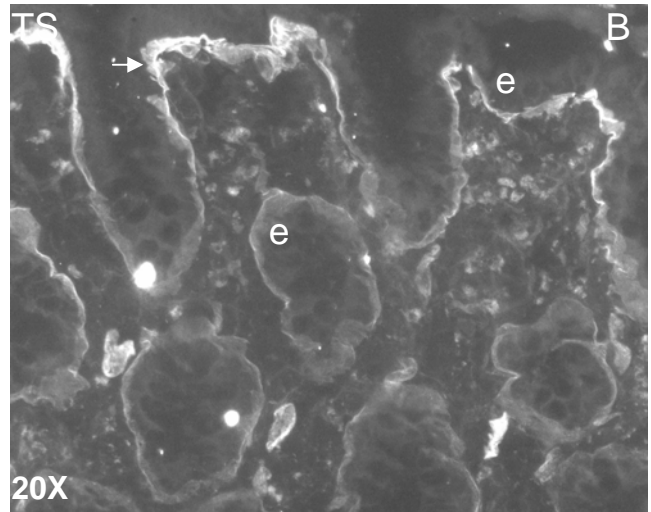
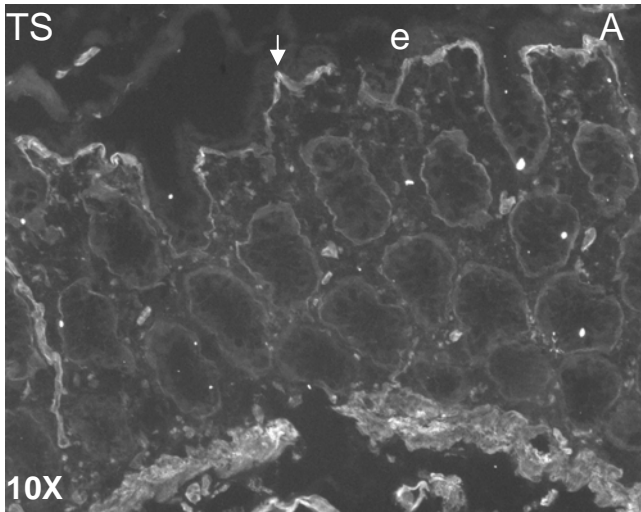
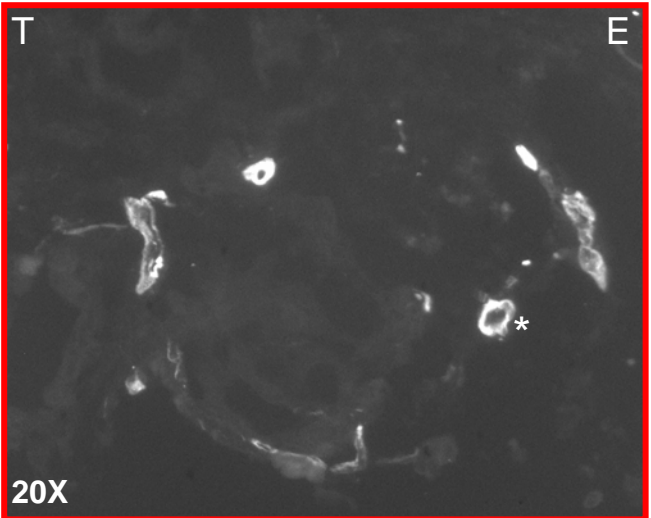


Figure 78 : Expression de la chaîne $\alpha 5$ dans l'adénocarcinome envahissant le péritoine (T4N2M1)

TS: tissu sain; T: tumeur (encadré rouge); e: épithélium

Les flèches blanches montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales glandulaires.

Les astérisques montrent l'expression de la chaîne $\alpha 5$ autour des vaisseaux sanguins.



III. Discussion des résultats

Par cette étude, j'ai montré une modification du profil d'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le cancer colorectal. J'ai mis en évidence le potentiel rôle ambivalent de cette molécule extracellulaire dans la progression tumorale.

En effet, ces résultats suggèrent que la chaîne $\alpha 5$ de laminine, en tant que charpente cellulaire et molécule signal, pourrait avoir un rôle facilitateur dans le développement de tumeurs encore différenciées. La chute d'expression observée dans les zones d'architecture très perturbée pourrait être due à une présence élevée de métalloprotéases au sein de ces zones tumorales de haut grade ou à une absence de sécrétion consécutive à la perturbation de la régulation génique dans ces cellules tumorales. Cette chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$, en empêchant la bonne organisation de lames basales permettrait, à ce stade tumoral avancé, l'invasion du tissu environnant par les cellules cancéreuses.

Dans les glandes tumorales **bien différenciées**, où la chaîne $\alpha 5$ est **sur-exprimée**, la chaîne $\alpha 5$ pourrait induire des signaux oncogéniques. J'ai précédemment montré que la chaîne $\alpha 5$ pouvait induire la **prolifération** des cellules épithéliales intestinales (publication 1, figure 7). Sa sur-expression pourrait activer la prolifération des cellules tumorales. J'ai également montré que la chaîne $\alpha 5$ est capable d'augmenter l'expression et l'activation d'Akt et avoir par ce biais un effet **anti-apoptotique**. La forte expression de la chaîne $\alpha 5$ le long des glandes tumorales pourrait ainsi participer à la sur-expression et sur-activation d'Akt, phénomène retrouvé dans les cancers coliques et qui induit l'immortalité des cellules tumorales (Altomare et Testa, 2005). La potentielle sur-activation d'Akt par la chaîne $\alpha 5$ dans les tumeurs coliques pourrait également conférer un rôle à la chaîne $\alpha 5$ dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la sérine/thréonine kinase ILK activable par les intégrines, et donc potentiellement par les laminines, est également sur-exprimée dans le cancer colique conjointement à l'activation d'Akt et à la répression de l'E-cadhérine, événements essentiels à la transition épithélio-mésenchymateuse (Bravou et al., 2006). D'autres études ont suggéré l'implication d'ILK dans la régulation de l'expression de la E-cadhérine (Wu et al., 1998; Tan et al., 2001) appuyant un potentiel rôle d'ILK dans l'EMT.

J'ai vainement tenté de réaliser des immunomarquages d'Akt et de sa forme activée pour rechercher une potentielle corrélation entre son expression ou activation et l'expression de la chaîne $\alpha 5$. Mais aucun des anticorps testés n'a montré d'efficacité en immunofluorescence.

Au niveau des zones **peu différenciées** et dans les tumeurs hautement invasives, la **perte d'expression** de la chaîne $\alpha 5$ est certainement nécessaire à **l'invasion tumorale**. Il est bien en effet établi que des altérations de la lame basale se produisent dans les tumeurs colorectales et sont corrélées à leur degré de malignité. Les laminines présentes des sites de clivages par les MMP (Matrix MétalloProtéases). Or les MMP sont produites en abondance par les cellules invasives afin de détruire la barrière de la lame basale. La chaîne $\alpha 5$ est une cible de MMP, notamment de MT1-MMP dans le cancer de la prostate (Bair et al., 2005). Une étude a montré que les fragments résultant de la protéolyse de la laminine-111 auraient un rôle actif dans l'invasion tumorale (Ghosh et Stack, 2000). Une telle hypothèse peut être faite pour la chaîne $\alpha 5$ d'autant plus que j'ai précédemment démontré que la laminine-511 pouvait induire la **migration** des cellules épithéliales intestinales (publication 1, figure 7). De plus, nous avons vu dans l'introduction qu'un peptide de la chaîne $\alpha 5$ est capable d'induire l'expression de MMP 9 et MMP 14 (Adair-Kirk et al., 2003). La perte d'expression de la chaîne $\alpha 5$ résulte certainement d'un clivage protéolytique pouvant laisser des fragments résiduels ayant un effet positif sur la dissémination des cellules tumorales et lui conférant un **rôle triphasique dans la progression tumorale** (figure 79).

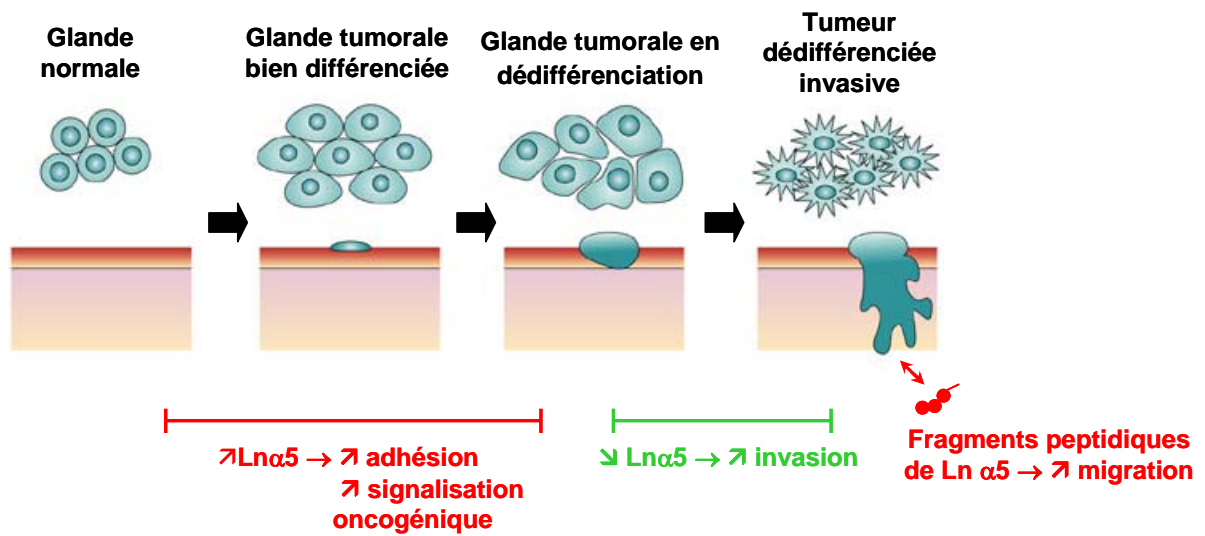


Figure 79 : Modèle proposé pour l'implication triphasique de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la progression tumorale

Impact

Ces résultats appuient l'importance du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement le remodelage de la matrice extracellulaire pour la progression tumorale. Ces résultats suggèrent un rôle triphasique de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le développement des CCR, révélant qu'il sera difficilement envisageable de l'utiliser comme cible thérapeutique. Cette analyse, menée sur un nombre assez faible d'échantillons, ne constitue qu'une étude préliminaire mais ouvre des perspectives intéressantes que nous aborderons dans le dernier chapitre de cet ouvrage.

5^{ème} Partie :

**Identification des facteurs de transcription essentiels à
la différenciation épithéliale de l'intestin**

Identification des facteurs de transcription essentiels à la différenciation épithéliale de l'intestin

Stegmann *et al.*, Am.J.Physiol, Physiological Genomics 2006

Au cours de mon doctorat, j'ai participé à un travail en collaboration avec l'équipe de Jorgen Olsen (Department of Medical Biochemistry and Genetics, The Panum Institute, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark) visant à identifier les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation épithéliale intestinale lors du développement fœtal et chez l'adulte par des analyses bioinformatiques, transcriptomiques et métaboliques. J'ai essentiellement participé à l'étude concernant le développement intestinal : préparation de nombreux échantillons, traitement des résultats et participation à la rédaction de l'article.

I. Résumé des résultats

Cette étude (publication 4) qui allie 3 stratégies a révélé que l'ensemble des gènes sur-exprimés lors de la différenciation épithéliale présentent un site de liaison au facteur hépatocytaire HNF-4. HNF-4 semble également influencer le métabolome villositaire en régulant des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Cette étude a ainsi permis d'identifier des facteurs de transcription essentiels au développement de l'intestin et à la fonction des cryptes intestinales: E2F pour la réplication de l'ADN et c-Myc pour le maintien des cellules souches intestinales.

Impact

Cette analyse a permis de construire un site Internet qui consiste en fait en une base de données indiquant les expressions des gènes présents dans l'intestin embryonnaire et dans l'intestin adulte de souris. Cette base permet, en un clic, de visualiser l'expression d'un gène d'intérêt de façon différentielle entre l'intestin embryonnaire et adulte, montrant ou non son implication dans le développement intestinal, mais également son profil d'expression entre les différents compartiments, comparant les expressions entre l'endoderme et le mésenchyme dans l'intestin embryonnaire et les différences d'expression entre le compartiments des cryptes et celui des villosités dans l'intestin adulte. Ce site constitue un outil très intéressant pour la recherche portant sur l'intestin.

II. Publication 4 :

Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation

Anders Stegmann, Morten Hansen, Yulan Wang, Janus B. Larsen, Leif R. Lund, Léa Ritié, Jeremy K. Nicholson, Bjørn Quistorff, Patricia Simon-Assmann, Jesper T. Troelsen and Jørgen Olsen

Physiol Genomics 27:141-155, 2006. First published Jul 25, 2006;
doi:10.1152/physiolgenomics.00314.2005

You might find this additional information useful...

Supplemental material for this article can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00314.2005/DC1>

This article cites 45 articles, 15 of which you can access free at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/27/2/141#BIBL>

This article has been cited by 3 other HighWire hosted articles:

Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4{alpha}1 Competes with Oncoprotein c-Myc for Control of the p21/WAF1 Promoter

W. W. Hwang-Verslues and F. M. Sladek
Mol. Endocrinol., January 1, 2008; 22 (1): 78-90.
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Hepatocyte nuclear factor-4 mediates apolipoprotein A-IV transcriptional regulation by fatty acid in newborn swine enterocytes

S. Leng, S. Lu, Y. Yao, Z. Kan, G. S. Morris, B. R. Stair, M. A. Cherny and D. D. Black
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, August 1, 2007; 293 (2): G475-G483.
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk

X. Li, B. B. Madison, W. Zacharias, A. Kolterud, D. States and D. L. Gumucio
Physiol Genomics, May 11, 2007; 29 (3): 290-301.
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/27/2/141>

Additional material and information about *Physiological Genomics* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/pg>

This information is current as of June 6, 2008 .

Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation

Anders STEGMANN, Morten HANSEN, Yulan WANG, Janus B. LARSEN, Leif R. LUND, Léa RITIÉ, Jeremy K. NICHOLSON, Bjørn QUISTORFF, Patricia SIMON-ASSMANN, Jesper T. TROELSEN and Jørgen OLSEN

Physiological genomics, 2006, Vol. 27, Pages 141-155

Pages 214-228 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00314.2005>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour objectif d'éclaircir le rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin. Les résultats obtenus ont permis de démontrer différentes fonctions de cette molécule de l'environnement cellulaire au sein de cet organe.

I. Rôles de la chaîne $\alpha 5$ laminine dans l'intestin normal

A. Rôle dans la morphogenèse intestinale

La chaîne $\alpha 5$ est nécessaire à l'organogenèse de l'intestin. En effet, les intestins embryonnaires des souris Lama5^{-/-} sont de taille réduite et présentent davantage de circonvolutions (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Ce phénotype ressemble à celui de plusieurs autres modèles murins, en l'occurrence des souris modifiées pour les gènes Hlx, TGF- α et RAR. Cette présente étude a révélé, en l'absence de chaîne $\alpha 5$, une surexpression de **Hlx**. Hlx est un gène homéotique qui participe aux interactions épithélio-mésenchymateuses nécessaires à l'organogenèse. Or les souris invalidées pour Hlx présentent à E14,5, comme les souris Lama5^{-/-}, un intestin de taille réduite (Hentsch et al., 1996). Ces intestins Hlx^{-/-} ont un défaut d'élongation et de circonvolutions. Vu le parallélisme phénotypique des invalidations d'Hlx et de la chaîne $\alpha 5$, la sur-expression d'Hlx dans les intestins Lama5^{-/-} pourrait être le fait d'une compensation moléculaire visant à corriger les défauts de morphogenèse induits par l'absence de la chaîne $\alpha 5$, en particulier les anomalies au niveau du muscle lisse en formation. Cette hypothèse est confortée par le fait que Hlx interagit directement sur le promoteur de l' α -actine du muscle lisse (Bates MD, communication personnelle).

Par ailleurs, les souris qui surexpriment le **TGF- α** présentent une augmentation de la taille et de la masse épithéliale intestinale (Sandgren et al., 1990). Les souris invalidées pour TGF- α ne présentent pourtant pas d'anomalies de développement du tractus gastro-intestinal (Luetteke et al., 1993). Nous n'avons malheureusement pas pu conclure à une éventuelle sous-expression du TGF- α dans les intestins Lama5^{-/-} car le TGF- α n'était pas présent sur les puces.

De manière intéressante, j'ai en revanche trouvé une sur-expression du récepteur à l'acide rétinoïque, **Rar α** , en absence de chaîne $\alpha 5$ (publication 1, table 2). Or l'implication de l'acide rétinoïque dans l'acquisition des circonvolutions de l'intestin a été démontrée (Pitera et al., 2001). Le traitement des embryons avec l'acide rétinoïque compromet en fait la formation des circonvolutions intestinales. La sur-expression de ce récepteur dans les intestins Lama5^{-/-} pourrait correspondre à une compensation moléculaire pour pallier la circonvolution excessive.

B. Rôle dans la différenciation des cellules intestinales

1. Rôle dans la différenciation tardive des entérocytes

Ce présent travail a démontré que la chaîne $\alpha 5$ est impliquée dans la **différenciation fonctionnelle des cellules endodermiques**. Nous avons vu, dans l'introduction, l'**importance des interactions épithélio-mésenchymateuses** pour la cytodifférenciation de l'endoderme intestinal. Ces interactions sont principalement dirigées par les molécules solubles Shh, BMP2 et 4 et Wnt, et par les molécules de la lame basale. La chaîne $\alpha 5$ ne régule pas l'expression du facteur soluble **Shh**, ADNc que j'avais ajouté sur les puces. Une chute de Shh avait pourtant été trouvée dans le tissu dentaire de souris Lama5^{-/-} en développement (Fukumoto et al., 2006). Parmi les **BMP**, seul BMP1 a été trouvé dérégulé dans les intestins Lama5^{-/-} (sous-expression), mais il n'est pas connu pour être impliqué dans les interactions tissulaires. Ce présent travail a révélé que l'absence de chaîne $\alpha 5$ induit une activation de la voie Wnt. Wnt est connu pour être impliqué dans la mise en place de l'endoderme définitif et donc dans la formation du tube digestif vers E8.5 (Gregorieff et Clevers, 2005). Cependant Kim et al. (2007) ont démontré que la voie Wnt n'est pas active à E13.5 et que son activation apparaît lors de l'émergence des villosités à

E16,5 dans les cellules post-mitotiques. De manière intéressante nos résultats ont montré une activation plus précoce dès E13.5 de la voie Wnt dans les intestins Lama5^{-/-}. Nos résultats actuels ne permettent toutefois pas de conclure à une relation directe entre présence de chaîne $\alpha 5$ et une répression de la voie Wnt. Par ailleurs, le fait que la voie Wnt ait tendance à être surstimulée dans les intestins Lama5^{-/-} ne corrèle pas avec la réduction du nombre de cellules à mucus retrouvée dans ces souris. En effet l'invalidation d'une signalisation Wnt active *in vivo* résulte, chez la souris, en une réduction du nombre de cellules à mucus (Korinek et al., 1998, Pinto et al., 2003, Ireland et al., 2004). Mais certains facteurs de transcription comme MATH1, par exemple, sont également impliqués dans ce déterminisme et pourraient être en cause dans les souris déficientes en chaîne $\alpha 5$. Nous n'avons pas pu le vérifier par « microarray », MATH1 n'étant pas présent sur les puces.

Dans l'intestin mature, la prolifération des cellules souches et des cellules intermédiaires est dépendante d'une stimulation de la voie Wnt. Cette voie est fortement activée dans le compartiment des cryptes. A l'inverse, la voie Wnt est totalement inhibée dans le compartiment villositaire où a lieu la différenciation des cellules épithéliales. Il a tout de même été montré que Wnt est impliqué dans le lignage des cellules sécrétoires mais son inactivation est nécessaire à la différenciation des entérocytes (Gregorieff et Clevers, 2005). Chez l'adulte, la chaîne $\alpha 5$ présente un profil d'expression inverse à l'activation de la voie Wnt, en étant absente des cryptes et par contre bien exprimée, avec un gradient croissant d'intensité, le long des villosités (Lefebvre et al., 1999 et données personnelles). Son profil d'expression, mis en parallèle de l'activation de la voie Wnt, est concordant avec mes résultats qui suggèrent que la chaîne $\alpha 5$ est importante pour la différenciation entérocytaire et qu'elle aurait un effet non permissif sur la voie Wnt. De plus, j'ai montré l'importance de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ pour la différenciation entérocytaire qui nécessite une extinction de la voie Wnt.

Les expériences réalisées *in vitro* sur les cellules épithéliales intestinales matures ont montré un impact de la chaîne $\alpha 5$, via Akt, sur l'étalement et la morphologie de ces cellules. Il a été démontré qu'une activité de la PI3K est nécessaire à la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules intestinales Caco2 (Laprise et al., 2002). La chaîne $\alpha 5$ présente une fonction cellulaire similaire sur les cellules épithéliales dentaires en culture, également d'une façon dépendante de la PI3K (Fukumoto et al., 2006). De précédentes études menées au laboratoire ont montré l'implication de la laminine-111 dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales Caco2 (induction du gène Cdx2 et de la saccharase-isomaltase) (Lorentz et al., 1997, Turck et al., 2005). La chaîne $\alpha 1$ de laminine est exprimée, à l'inverse de la chaîne $\alpha 5$, dans le compartiment prolifératif des cryptes et non le long des villosités. La confrontation de ces résultats laisse penser que la chaîne $\alpha 1$ pourrait jouer un rôle dans la différenciation précoce des cellules intermédiaires en entérocytes et la chaîne $\alpha 5$ dans la différenciation plus tardive et dans le maintien de cette différenciation et de la fonctionnalité des entérocytes le long de la villosité. La létalité embryonnaire des souris Lama5^{-/-} a limité l'analyse du rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la fonction digestive, mais le fait qu'elle régule l'expression de gènes codant pour des enzymes digestives et des transporteurs des acides gras et du cholestérol appuie son rôle dans la complète fonctionnalité des entérocytes matures en terme de digestion et de métabolisation des lipides.

D'autres études ont démontré *in vivo* l'implication de la chaîne $\alpha 5$ dans la différenciation de cellules épithéliales dans d'autres organes. C'est notamment le cas lors du développement pulmonaire où la chaîne $\alpha 5$ est requise pour la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires (Nguyen et al., 2005). La chaîne $\alpha 5$ est également nécessaire à la différenciation des podocytes lors du développement rénal (Miner et al., 2000).

Il est difficile d'attribuer un récepteur à cette fonction de la chaîne $\alpha 5$ dans la différenciation entérocytaire. La chute d'expression de la sous-unité $\alpha 3$ d'intégrine et du Luthéran au pôle basal des cellules endodermiques dans les intestins Lama5^{-/-} (Bolcato-Bellemin et al., 2003), laisse prévaloir leur implication dans cette fonction de la chaîne $\alpha 5$. Toutefois l'invalidation du Luthéran chez la souris ne compromet ni la différenciation ni le bon fonctionnement des cellules

épithéliales (publication 2). Cette difficulté est augmentée par le fait que nous avons trouvé, par « microarray » des compensations de l'absence de chaîne $\alpha 5$ par la sur-expression des sous-unités αv , αM et $\beta 4$ d'intégrine.

2. Rôle dans la différenciation des cellules musculaires lisses

Le défaut de différenciation du muscle lisse intestinal dans les intestins Lama5^{-/-} avait été antérieurement démontré au laboratoire (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Cette étude m'a permis de confirmer ce rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses et surtout d'en éclaircir les bases moléculaires.

Je tiens à préciser que ni l'expression de Shh, ni de celle de Ihh n'ont pas été trouvées modifiées dans les intestins Lama5^{-/-}, alors que les souris invalidées pour ces gènes présentent des anomalies de formation de la partie proximale du tube digestif, associées notamment à une désorganisation du mésenchyme et à une réduction de l'épaisseur du muscle lisse qui semble responsable d'une circonvolution excessive (Ramalho-Santos et al., 2000), comme cela est le cas dans les mutants Lama5^{-/-}.

Cependant, nous avons pu montrer la modulation d'autres gènes impliqués dans la différenciation du muscle lisse, dans la régénération musculaire et dans la motricité intestinale. Ces résultats appuient le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans le **développement** du muscle et lui suggère un rôle dans la fonctionnalité du muscle intestinal **mature** et dans sa régénération. Ce dernier point est appuyé par le fait que l'expression de la chaîne $\alpha 5$ est augmentée dans les dystrophies musculaires (Patton et al., 1999).

Dans cette étude, j'ai par ailleurs montré que le récepteur Luthéran est essentiel à l'intégrité du muscle intestinal. Ce résultat amène à postuler que le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans le muscle intestinal passe essentiellement par ce récepteur. Ce postulat est appuyé par la chute d'expression du Luthéran dans le muscle des intestins Lama5^{-/-} alors que les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$ d'intégrine ne voit pas leur expression modifiée dans ce compartiment (Bolcato-Bellemin et al., 2003).

C. Rôle dans la prolifération des cellules intestinales

Notre étude transcriptomique a révélé, dans les intestins Lama5^{-/-}, la dérégulation d'un certain nombre de gènes impliqués dans la prolifération, indiquant l'implication de la chaîne $\alpha 5$ dans ce processus. Ces résultats sont corroborés par des expériences *in vitro* qui ont montré que la laminine-511 augmentait la prolifération des cellules épithéliales m-IC_{cl2}. Ce résultat est étonnant du fait de la localisation de la chaîne $\alpha 5$ le long de la villosité et non dans le compartiment prolifératif des cryptes. Il faut toutefois noter que les cellules utilisées possèdent des caractéristiques de cellules de crypte et sont donc peut-être plus sensibles à des signaux favorisant la prolifération. Une telle constatation avait déjà été faite avec les cellules épithéliales tumorales Caco2/TC7 (Turck et al., 2005).

D'autres études ont également montré l'implication de la chaîne $\alpha 5$ sur la prolifération de cellules épithéliales dans d'autres organes. C'est notamment le cas pour les cellules épithéliales dentaires. La prolifération de ces cellules est réduite de 2 fois dans le bourgeon dentaire Lama5^{-/-} et à l'inverse la laminine-511 augmente le nombre de cellules épithéliales dentaires en culture (Fukumoto et al., 2006). L'invalidation conditionnelle du gène Lama5 dans les cellules épithéliales pulmonaires engendre une diminution de leur prolifération (Nguyen et al., 2005) et à l'inverse les matrices enrichies en laminine-511 augmentent clairement la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires AEC en culture (Buckley et al., 1998, Buckley et al., 1999).

Cette stimulation de la prolifération cellulaire par la chaîne $\alpha 5$ n'est pas restreinte au compartiment épithélial. En effet, il avait été montré au laboratoire une chute de la prolifération des cellules musculaires lisses en différenciation par un marquage du KI-67 (Bolcato-Bellemin et al., 2003). J'ai confirmé cette observation en culture, où les cellules mésenchymateuses Lama5^{-/-}

présentent une diminution de leur capacité à proliférer par rapport aux cellules mésenchymateuses sauvages.

D. Rôle dans la survie des cellules intestinales

J'ai montré que la chaîne $\alpha 5$ avait un rôle anti-apoptotique en activant la voie Akt dans l'intestin. Il est bien établi que Akt est une molécule essentielle à la survie cellulaire. Son action anti-apoptotique se fait à plusieurs niveaux (Vivanco et Sawyers, 2002; Song et al., 2005.). D'une part, Akt régule directement l'apoptose en phosphorylant BAD inhibant ainsi sa liaison avec les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-XL qui bloquent la libération du cytochrome C au niveau des mitochondries. Akt inhibe aussi directement la caspase-9. D'autre part Akt régule le contrôle transcriptionnel de l'apoptose en phosphorylant Mdm2 induisant en conséquence l'inactivation de p53 et l'activation de NF- κ B permettant la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-XL. Enfin, Akt est capable d'inhiber la translocation nucléaire de facteurs de transcription de la famille Forkhead (FKHR) et donc l'activation de leurs gènes cibles pro-apoptotiques BIM et FAS ligand.

Dans l'intestin mature, la laminine-511 induit clairement l'activation d'Akt dans les cellules épithéliales, et non dans les cellules musculaires, et favorise leur survie. La signification physiologique du rôle anti-apoptotique de la signalisation chaîne $\alpha 5$ /Akt reste à définir *in vivo* et à étudier par rapport à leur expression le long de l'axe crypto-villositaire. Il est tout d'abord intéressant de constater que l'expression d'Akt est **parallèle** à celle de la chaîne $\alpha 5$ (Li et al, 2004). Ces deux molécules présentent un gradient d'intensité croissante vers le haut des villosités ou des glandes coliques. Or l'épithélium intestinal est soumis à un fort renouvellement cellulaire associé à un détachement des cellules épithéliales au sommet des villosités/glandes. L'action anti-apoptotique de la chaîne $\alpha 5$ et sa forte action adhésive vont à l'encontre de sa forte expression en haut des villosités/glandes où les cellules se détachent de la lame basale. Peut-être que la chaîne $\alpha 5$ favorise la survie des cellules tout le long de la villosité, les protégeant notamment de l'agressivité du contenu luminal, mais que d'autres événements moléculaires induisant progressivement la mort des cellules épithéliales prennent le dessus au sommet des villosités, ce qui expliquerait l'augmentation d'expression de la chaîne $\alpha 5$ en guise de tentative de compensation.

A l'inverse, le fait que la chaîne $\alpha 5$ et Akt ne soient pas exprimés en haut des cryptes a peut-être un effet permissif sur les phénomènes d'apoptose qui peuvent intervenir à ce niveau pour le contrôle des cellules prolifératives présentes dans cette zone.

D'autres travaux ont démontré ce rôle anti-apoptotique de la chaîne $\alpha 5$ dans d'autres organes. Nguyen et al (2005) ont montré une augmentation de l'apoptose dans les cellules épithéliales pulmonaires Lama5 $^{-/-}$. De plus Gu et al. (2002) ont montré que la laminine-511/521 peut sauver les cellules pulmonaires cancéreuses A549 de l'apoptose induite par une privation en sérum, ce également via l'activation d'Akt.

Il est dommage que les expériences que j'ai menées pour tenter d'identifier le(s) récepteur(s) qui médie(nt) le rôle anti-apoptotique de la chaîne $\alpha 5$ n'aient pas été concluantes. Dufour et al. (2004) ont montré que l'inhibition de la sous-unité $\beta 1$ d'intégrine induit l'apoptose des cellules et une baisse d'activation d'Akt1. Par ailleurs, Fukumoto et al. (2005) ont montré que l'interaction entre la laminine-511 et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est nécessaire à l'activation de la voie PI3K/Akt dans l'épithélium dentaire. D'autres études ont montré que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et le dystroglycane pouvaient également être impliqués dans l'activation d'Akt (Bao et al., 2004 et Langenbach et Rando al., 2002 respectivement). L'ensemble de ces données met en exergue la diversité des récepteurs pour un même type de réponse suivant le type cellulaire, et ne permet pas de postuler sur l'implication d'un récepteur en particulier, pour le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la survie des cellules épithéliales dans le cas de l'intestin.

Au niveau du muscle, l'analyse des intestins invalidés pour le Luthéran a montré que l'absence d'interaction laminine- $\alpha 5$ /Luthéran engendre des phénomènes de **nécrose** plutôt que d'apoptose. Ainsi la chaîne $\alpha 5$ participe à l'**homéostasie intestinale** de par son rôle anti-apoptotique, mais la dérégulation de son signal peut entraîner la destruction tissulaire par mort cellulaire passive et pathologique.

E. Rôle dans la migration des cellules épithéliales

Ce travail m'a permis de démontrer l'action positive de la laminine-511 sur la migration des cellules épithéliales de l'intestin *in vitro*. Ce résultat suggère que, *in vivo*, la chaîne $\alpha 5$ est capable de guider la migration des cellules épithéliales le long de la villosité/glande. Outre son rôle anti-apoptotique décrit précédemment, Akt est également impliqué dans les processus de migration (Grille et al., 2003, Meng et al., 2006). Pourtant la wortmannine, inhibiteur de cette voie, n'inhibe pas la migration des cellules épithéliales intestinales induite par la laminine-511. Une étude a montré que la laminine-511 induit la migration de cellules épithéliales pulmonaires A549 par l'activation de Rac *via* la voie de signalisation p130Cas-CrkII-DOCK180. Cette migration est inhibée par l'ajout d'anticorps bloquants anti-intégrine $\alpha 3$ ou $\beta 1$ (Gu et al., 2001). Ce même groupe a aussi démontré que la laminine-511 stimule la sécrétion de MMP-2 qui participe à la migration des cellules A549 sur cette même laminine. Pouliot et al. (2001) et Chia et al. (2007) ont également montré que la migration de cellules cancéreuses **coliques** et de cellules cancéreuses mammaires respectivement, est induite par la laminine-511 *via* l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ semble être le récepteur impliqué dans la migration des cellules épithéliales induite par la chaîne $\alpha 5$; il faudra le vérifier dans l'épithélium intestinal normal.

II. Rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin pathologique

Nous venons de voir que la chaîne $\alpha 5$ est impliquée dans de nombreux processus cellulaires essentiels au renouvellement cellulaire et à l'homéostasie intestinale. J'ai également montré par ce travail que la chaîne $\alpha 5$ était dérégulée dans 2 pathologies intestinales à savoir la **maladie de Hirschsprung** où la dérégulation concerne le compartiment **musculaire** et le **cancer colorectal** où la dérégulation est d'origine **épithéliale**.

A. Rôle dans la maladie de Hirschsprung

Pour la maladie de Hirschsprung, nous avons déjà discuté du fait que l'accumulation de la chaîne $\alpha 5$ au sein des intestins malades pourrait avoir un rôle dans l'établissement de cette pathologie, en inhibant partiellement la migration des cellules de la crête neurale. Il aurait par ailleurs été intéressant de savoir si les cas analysés présentaient des modifications de gènes classiquement impliqués dans cette maladie. Au vu de la dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ dans les intestins des patients, j'ai vérifié le statut de ces gènes dans les données de l'analyse transcriptomique des intestins Lama5^{-/-}. Seuls Sox10, EDNR-B (récepteur de l'endothéline-3) et Hoxa9 sont représentés sur les puces utilisées et l'absence de chaîne $\alpha 5$ n'a pas d'incidence sur l'expression de ces gènes, du moins dans l'intestin embryonnaire. Pourtant, il a été montré que les souris Lama5^{-/-} présentent un délai de formation des neurones périphériques associé à un retard d'expression de Sox10 mais à un stade plus précoce de développement (E10) (Coles et al., 2006).

B. Rôle dans le cancer colorectal

Concernant la dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ dans le cancer colorectal, j'ai montré que cette chaîne présente 2 types de dérégulation. Dans les zones tumorales encore différenciées, la chaîne $\alpha 5$ est plutôt sur-exprimée alors que son expression chute dans les zones peu différenciées.

La **localisation chromosomique** du gène Lama5 pourrait en partie expliquer la sur-expression de la chaîne $\alpha 5$ le long des glandes tumorales. Nous avons vu dans l'introduction que le gène Lama5 est situé, chez l'homme, sur le chromosome 20 au niveau du locus 20q13.33. Il a été très intéressant de constater que cette région est très fréquemment **amplifiée** dans les cancers colorectaux (près de 80% des cas) (Tsafrir et al., 2006 et Guénot D INSERM U682, communication personnelle).

Dans les glandes tumorales encore différenciées, la sur-expression de la chaîne $\alpha 5$ peut contribuer à la sur-expression et sur-activation d'Akt qui stimulent l'immortalisation des cellules tumorales et leur transition épithélio-mésenchymateuse. Dans les zones plus altérées, la chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$ permet ensuite l'invasion des tissus sous-jacents par les cellules cancéreuses. Cette perte d'expression pourrait alors induire une activation de la voie Wnt permettant le maintien de la dédifférenciation et la prolifération anormale des cellules. Le fait que la chaîne $\alpha 5$ puisse à la fois stimuler la sécrétion de métalloprotéases et en être la cible, et que la présence de ces enzymes protéolytique soit nécessaire à la migration cellulaire qu'elle promeut, appuie l'hypothèse d'un rôle actif de fragments peptidiques résiduels de la chaîne $\alpha 5$ après le clivage de la lame basale.

En accord avec nos résultats, les travaux de Akashi et al. (2001), réalisés *in vivo* dans le cancer du poumon, ont révélé une expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les zones peu altérées et une chute d'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans les foyers prolifératifs (Akashi et al., 2001). Dans le cancer de la prostate, la perte de la chaîne $\alpha 5$ suite à un clivage est requise pour l'invasion tumorale (Bair et al., 2005). Par contre, une autre étude portant sur le cancer du sein a plutôt montré une sur-expression de la chaîne $\alpha 5$ dans toutes les zones des tumeurs invasives, et qui est maintenue dans les métastases (Chia et al., 2007). Cette étude irait en faveur d'une contribution de la chaîne $\alpha 5$ au processus métastatique. Cependant cette étude a été réalisée sur des tumeurs murines obtenues par injection de cellules tumorales dans la glande mammaire de souris sauvages. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés sur des prélèvements de tumeurs mammaires humaines qui montrent une expression variable et hétérogène de la chaîne $\alpha 5$ au sein d'une même tumeur, avec la présence de discontinuités de marquage de la chaîne $\alpha 5$ au niveau de la lame basale, concordante avec l'augmentation des altérations néoplasiques, comme cela est le cas dans notre étude.

L'ensemble de ces données appuie le modèle hypothétique que j'ai proposé dans la 4^{ème} partie des Résultats (figure 79) et atteste de l'implication de la chaîne $\alpha 5$ dans la progression tumorale.

Les fonctions de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin mises en évidence par cette étude sont résumées sur la figure 80. Ce travail montre bien l'importance du microenvironnement cellulaire pour l'équilibre physiologique et l'intégrité du tissu intestinal.

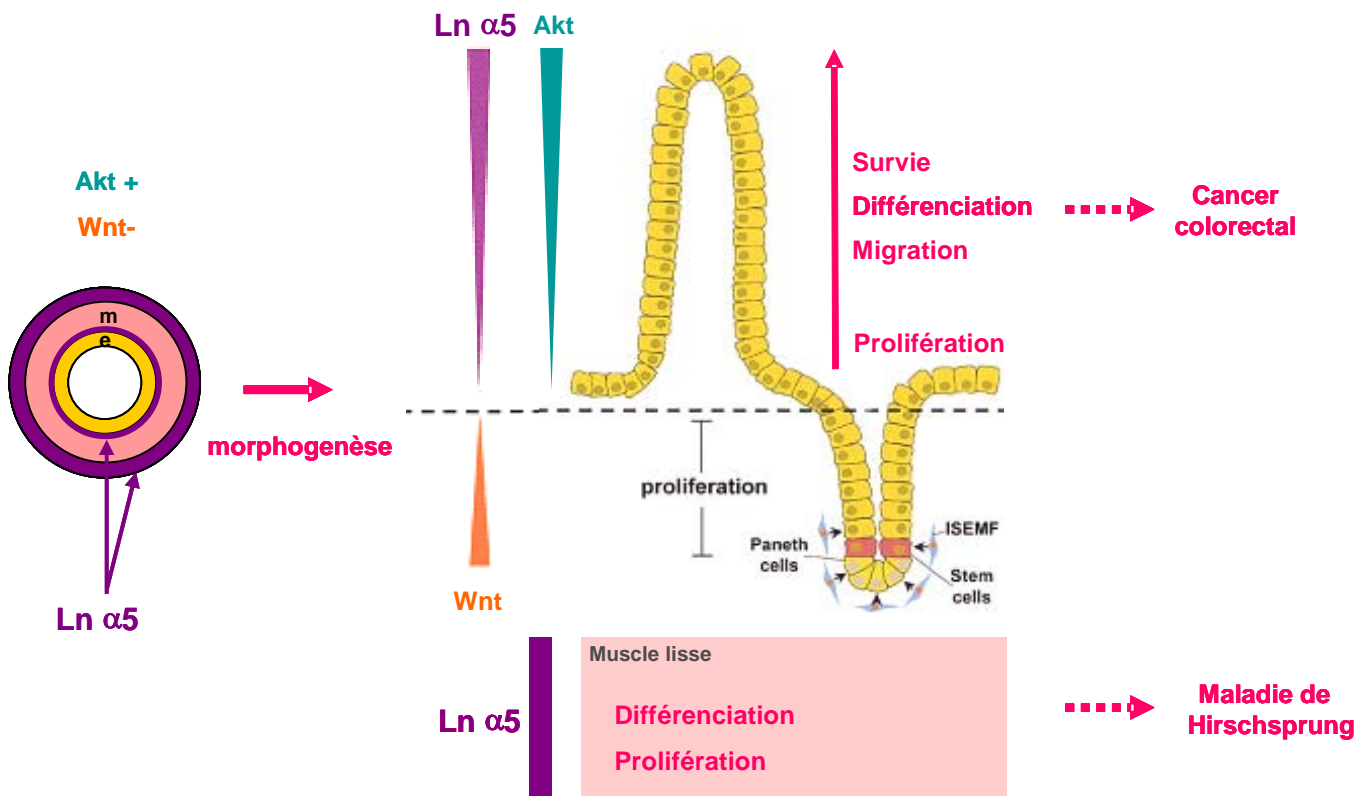


Figure 80 : Schéma récapitulatif des fonctions de la chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin

La localisation de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ est indiquée par les marquages violets.

Les fonctions de la chaîne $\alpha 5$ sont indiquées en rose.

Les flèches discontinues indiquent des dérégulations d'expression de la chaîne $\alpha 5$.

III. Perspectives

♦ Ce travail a révélé de nombreuses cibles de la chaîne $\alpha 5$, qui n'ont pas pu être toutes étudiées en détail. Il serait bien sûr intéressant d'en poursuivre l'analyse. Je me focaliserais sur 3 aspects : (i) la confirmation de la dérégulation des gènes impliqués dans la **prolifération**, (ii) l'étude d'une potentielle régulation de la signalisation liée à l'**acide rétinolique**, (iii) confirmation de la dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans l'**inflammation**. Les résultats du « microarray » ont en effet révélé la modification de plusieurs cytokines et de leurs récepteurs. De plus une étude a montré qu'un peptide de la chaîne $\alpha 5$ peut avoir un effet attracteur sur les neutrophiles et macrophages et induire l'activation de ces derniers et l'augmentation de la synthèse de cytokines et récepteurs associés (Adair-kirk et al., 2003). Ces données suggèrent un potentiel rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'inflammation. Nous avons d'ailleurs débuté au laboratoire une analyse de l'expression des laminines dans les maladies inflammatoires intestinales, à savoir la maladie de Crohn., les sigmoïdites et les rectocolites hémorragiques.

◆ Par ailleurs, les résultats de ce travail suggèrent un rôle important de la chaîne $\alpha 5$ dans la digestion, la métabolisation et la progression du bol alimentaire. La létalité embryonnaire des souris Lama5^{-/-} ne m'a pas permis de le confirmer au niveau physiologique.

Des modèles murins d'**invalidation conditionnelle du gène Lama5** permettront de poursuivre cette analyse. Nous avons déjà acquis deux modèles de souris grâce au système Cre-Lox, correspondant d'une part à une invalidation du gène Lama5 dans le compartiment **épithélial** en plaçant la recombinaison Cre sous le contrôle du **promoteur villine**, et d'autre part, à une invalidation de Lama5 spécifiquement dans le **muscle intestinal**, par régulation de la recombinaison Cre par le **promoteur SM-22**. Cette étude est réalisée en collaboration avec les équipes du Dr Sylvie Robine (Institut Curie, Paris) et du Dr Lydia Sorokin (Université de Münster, Allemagne). L'analyse phénotypique de ces souris vient de débutée.

◆ Au vu de l'accumulation de chaîne $\alpha 5$ dans la maladie de Hirschsprung, il sera par ailleurs intéressant d'établir une lignée de souris transgénique **sur-exprimant** la chaîne $\alpha 5$ dans le muscle intestinal en plaçant l'ADNc de la chaîne $\alpha 5$ sous le contrôle du **promoteur SM-22**. Il s'agira de voir si cette sur-expression engendre une aganglionose intestinale et pourrait constituer un modèle d'étude de cette pathologie. Ce travail permettrait de définir clairement si le microenvironnement matriciel, en l'occurrence la chaîne $\alpha 5$ a un impact sur la migration/différenciation des cellules de la crête neurale.

◆ Par ce travail, j'ai également montré l'implication de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans le cancer colorectal et proposé un schéma d'action triphasique de la chaîne $\alpha 5$ dans la progression tumorale. Il sera intéressant de confirmer ce modèle en analysant l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans un plus grand nombre de tumeur colorectale. J'ai montré que la chaîne $\alpha 5$ est capable de réguler deux voies de signalisation connues pour être impliquées dans la tumorigenèse, la voie Wnt et la voie PI3K/Akt. Il serait très intéressant de rechercher une corrélation entre l'altération de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et de celle des voies PI3K/Akt et Wnt dans les tumeurs colo-rectales. Cette analyse pourra, par exemple, être réalisée par des co-marquages de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ et de l'activation des voies Akt (anticorps Phospho-Akt) et Wnt (détection de la β -caténine nucléaire) par immunohistochimie, afin de définir si ces voies sont dérégulées dans les mêmes zones où a lieu la dérégulation de la chaîne $\alpha 5$.

L'étude du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la tumorigenèse et la progression tumorale pourra également être poursuivie à l'aide d'un modèle murin. Mon hypothèse est qu'une sur-expression de la chaîne $\alpha 5$ pourrait stimuler la tumorigenèse. Pour étudier cette hypothèse, nous avons généré un modèle murin de **sur-expression** de la chaîne $\alpha 5$ de laminine spécifiquement dans l'**épithélium intestinal**. La construction a été réalisée en plaçant l'ADNc de la chaîne $\alpha 5$ sous le contrôle du **promoteur villine**. Les lignées de souris fondatrices ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, Génopôle). Après l'analyse phénotypique de ces souris, il sera intéressant d'examiner l'expression et l'activation des voies Akt et Wnt suite à la modification d'expression de la chaîne $\alpha 5$. Ce modèle permettra ensuite d'étudier le possible effet de facilitation de la chaîne $\alpha 5$ sur le développement tumoral ou métastatique. Pour ce faire, des tumeurs pourront être induites chez ces souris transgéniques par **induction chimique** (traitement à l'azoxyméthane) ou par **induction génétique** en croisant les souris transgéniques avec des souris mutées pour APC (disponibles au laboratoire). Une comparaison de la rapidité de la progression tumorale pourra alors être réalisée (analyse histologique et immunomarquage de l'angiogenèse, par exemple) entre les souris sur-exprimants la chaîne $\alpha 5$ et les souris contrôles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Adair-Kirk,T.L., Atkinson,J.J., Broekelmann,T.J., Doi,M., Tryggvason,K., Miner,J.H., Mecham,R.P., and Senior,R.M. (2003): A site on laminin alpha 5, AQARSAASKVKVSMKF, induces inflammatory cell production of matrix metalloproteinase-9 and chemotaxis. *Journal of Immunology*, 171:398-406.

Adair-Kirk,T.L., Atkinson,J.J., Kelley,D.G., Arch,R.H., Miner,J.H., and Senior,R.M. (2005): A chemotactic peptide from laminin alpha 5 functions as a regulator of inflammatory immune responses via TNF alpha-mediated signaling. *Journal of Immunology*, 174:1621-1629.

Akashi,T., Ito,E., Eishi,Y., Koike,M., Nakamura,K., and Burgeson,R.E. (2001): Reduced expression of laminin alpha 3 and alpha 5 chains in non-small cell lung cancers. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92:293-301.

Altomare,D.A. and Testa,J.R. (2005): Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24:7455-7464.

Aumailley,M., Bruckner-Tuderman,L., Carter,W.G., Deutzmann,R., Edgar,D., Ekblom,P., Engel,J., Engvall,E., Hohenester,E., Jones,J.C.R., Kleinman,H.K., Marinkovich,M.P., Martin,G.R., Mayer,U., Meneguzzi,G., Miner,J.H., Miyazaki,K., Patarroyo,M., Paulsson,M., Quaranta,V., Sanes,J.R., Sasaki,T., Sekiguchi,K., Sorokin,L.M., Talts,J.F., Tryggvason,K., Uitto,J., Virtanen,I., der Mark,K., Wewer,U.M., Yamada,Y., and Yurchenco,P.D. (2005): A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology*, 24:326-332.

B

Baas,A.F., Smit,L., and Clevers,H. (2004): LKB1 tumor suppressor protein: PARTaker in cell polarity. *Trends Cell Biol.*, 14:312-319.

Bair,E.L., Chen,M.L., McDaniel,K., Sekiguchi,K., Cress,A.E., Nagle,R.B., and Bowden,G.T. (2005): Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. *Neoplasia.*, 7:380-389.

Bao,S., Ouyang,G., Bai,X., Huang,Z., Ma,C., Liu,M., Shao,R., Anderson,R.M., Rich,J.N., and Wang,X.F. (2004): Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, 5:329-339.

Barresi,R. and Campbell,K.P. (2006): Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J.Cell Sci.*, 119:199-207.

Bens,M., Bogdanova,A., Cluzeaud,F., Miquerol,L., Kerneis,S., Kraehenbuhl,J.P., Kahn,A., Pringault,E., and Vandewalle,A. (1996): Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am.J.Physiol*, 270:C1666-C1674

Berman,A.E., Kozlova,N.I., and Morozevich,G.E. (2003): Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc.)*, 68:1284-1299.

Bolcato-Bellemin,A.L., Lefebvre,O., Arnold,C., Sorokin,L., Miner,J.H., Kedingler,M., and Simon-Assmann,P. (2003): Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev.Biol*, 260:376-390.

Bolcato-Bellemin,A.-L., Lefebvre,O., and Simon-Assmann,P. (2004): Les laminines en physiopathologie digestive. *Hépatogastro*, 11:137-146.

Bravou,V., Klironomos,G., Papadaki,E., Taraviras,S., and Varakis,J. (2006): ILK over-expression in human colon cancer progression correlates with activation of beta-catenin, down-regulation of E-cadherin and activation of the Akt-FKHR pathway. *J.Pathol.*, 208:91-99.

Breau,M.A., Pietri,T., Eder,O., Blanche,M., Brakebusch,C., Fassler,R., Thiery,J.P., and Dufour,S. (2006): Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development*, 133:1725-1734.

Brown,S., McGrath,M.J., Ooms,L.M., Gurung,R., Maimone,M.M., and Mitchell,C.A. (1999): Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J.Biol.Chem.*, 274:27083-27091.

Buckley,S., Barsky,L., Driscoll,B., Weinberg,K., Anderson,K.D., and Warburton,D. (1998): Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am.J.Physiol*, 274:L714-L720

Buckley,S., Driscoll,B., Barsky,L., Weinberg,K., Anderson,K., and Warburton,D. (1999): ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am.J.Physiol*, 277:L159-L166

C

Chia,J., Kusuma,N., Anderson,R., Parker,B., Bidwell,B., Zamurs,L., Nice,E., and Pouliot,N. (2007): Evidence for a Role of Tumor-Derived Laminin-511 in the Metastatic Progression of Breast Cancer. *Am.J.Pathol.*,

Cohn,R.D., Henry,M.D., Michele,D.E., Barresi,R., Saito,F., Moore,S.A., Flanagan,J.D., Skwarchuk,M.W., Robbins,M.E., Mendell,J.R., Williamson,R.A., and Campbell,K.P. (2002): Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell*, 110:639-648.

Coles,E.G., Gammill,L.S., Miner,J.H., and Bronner-Fraser,M. (2006): Abnormalities in neural crest cell migration in laminin alpha5 mutant mice. *Dev.Biol.*, 289:218-228.

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

Crosnier,C., Stamatakis,D., and Lewis,J. (2006): Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat.Rev.Genet.*, 7:349-359.

D

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

Dassule,H.R. and McMahon,A.P. (1998): Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev.Biol.*, 202:215-227.

De Arcangelis,A., Lefebvre,O., Mechine-Neuville,A., Arnold,C., Klein,A., Remy,L., Kedinger,M., and Simon-Assmann,P. (2001): Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int.J.Cancer*, 94:44-53.

De Arcangelis,A., Mark,M., Kreidberg,J., Sorokin,L., and Georges-Labouesse,E. (1999): Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*, 126:3957-3968.

De Arcangelis,A., Neuville,P., Boukamel,R., Lefebvre,O., Kedinger,M., and Simon-Assmann,P. (1996): Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J.Cell Biol.*, 133:417-430.

Delehedde,M., Lyon,M., Sergeant,N., Rahmoune,H., and Fernig,D.G. (2001): Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, 6:253-273.

Duband,J.L. (2000): La longue marche des crêtes neurales. *Médecine/Sciences*, 16:776-783.

Dufour,G., Demers,M.J., Gagne,D., Dydensborg,A.B., Teller,I.C., Bouchard,V., Degongre,I., Beaulieu,J.F., Cheng,J.Q., Fujita,N., Tsuruo,T., Vallee,K., and Vachon,P.H. (2004): Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J.Biol.Chem.*, 279:44113-44122.

Durbeej,M., Talts,J.F., Henry,M.D., Yurchenco,P.D., Campbell,K.P., and Ekblom,P. (2001): Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation*, 69:121-134.

E

Ema,M., Faloon,P., Zhang,W.J., Hirashima,M., Reid,T., Stanford,W.L., Orkin,S., Choi,K., and Rossant,J. (2003): Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.*, 17:380-393.

Erickson,A.C. and Couchman,J.R. (2000): Still more complexity in mammalian basement membranes. *J.Histochem.Cytochem.*, 48:1291-1306.

Eyler,C.E. and Telen,M.J. (2006): The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. *Transfusion*, 46:668-677.

F

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

Fears,C.Y. and Woods,A. (2006): The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.*, 25:443-456.

Ferletta,M., Kikkawa,Y., Yu,H., Talts,J.F., Durbeej,M., Sonnenberg,A., Timpl,R., Campbell,K.P., Ekblom,P., and Genersch,E. (2003): Opposing roles of integrin alpha6Abeta1 and dystroglycan in laminin-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol.Biol.Cell*, 14:2088-2103.

Fodde,R. (2002): The APC gene in colorectal cancer. *Eur.J.Cancer*, 38:867-871.

Fukumoto,S., Miner,J.H., Ida,H., Fukumoto,E., Yuasa,K., Miyazaki,H., Hoffman,M.P., and Yamada,Y. (2006): Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J.Biol.Chem.*, 281:5008-5016.

G

Garipey,C.E. (2001): Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. *Pediatr.Res.*, 49:605-613.

Genersch,E., Ferletta,M., Virtanen,I., Haller,H., and Ekblom,P. (2003): Integrin alphavbeta3 binding to human alpha5-laminins facilitates FGF-2- and VEGF-induced proliferation of human ECV304 carcinoma cells. *Eur.J.Cell Biol.*, 82:105-117.

Gerhart,J., Bast,B., Neely,C., Iem,S., Amegbe,P., Niewenhuis,R., Miklasz,S., Cheng,P.F., and George-Weinstein,M. (2001): MyoD-positive myoblasts are present in mature fetal organs lacking skeletal muscle. *J.Cell Biol.*, 155:381-392.

Ghosh,S. and Stack,M.S. (2000): Proteolytic modification of laminins: functional consequences. *Microsc.Res.Tech.*, 51:238-246.

Grapin-Botton,A. and Melton,D.A. (2000): Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet.*, 16:124-130.

Gregorieff,A. and Clevers,H. (2005): Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.*, 19:877-890.

Grille,S.J., Bellacosa,A., Upson,J., Klein-Szanto,A.J., van Roy,F., Lee-Kwon,W., Donowitz,M., Tschlis,P.N., and Larue,L. (2003): The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.*, 63:2172-2178.

Gu,J., Fujibayashi,A., Yamada,K.M., and Sekiguchi,K. (2002): Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J.Biol.Chem.*, 277:19922-19928.

Gu,J., Sumida,Y., Sanzen,N., and Sekiguchi,K. (2001): Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J.Biol.Chem.*, 276:27090-27097.

H

Ha,T.S., Barnes,J.L., Stewart,J.L., Ko,C.W., Miner,J.H., Abrahamson,D.R., Sanes,J.R., and Kasinath,B.S. (1999): Regulation of renal laminin in mice with type II diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 10:1931-1939.

Henning, S, J (1987): Functional development of the gastrointestinal tract. *Physiology of the Gastrointestinal tract, second edition* Johnson L.R., ED., Raven Press, New York, 285-300

Hentsch,B., Lyons,I., Li,R., Hartley,L., Lints,T.J., Adams,J.M., and Harvey,R.P. (1996): Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev.*, 10:70-79.

Hibino,S., Shibuya,M., Engbring,J.A., Mochizuki,M., Nomizu,M., and Kleinman,H.K. (2004): Identification of an active site on the laminin alpha 5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Research*, 64:4810-4816.

Hibino,S., Shibuya,M., Hoffman,M.P., Engbring,J.A., Hossain,R., Mochizuki,M., Kudoh,S., Nomizu,M., and Kleinman,H.K. (2005): Laminin alpha 5 chain metastasis- and angiogenesis-inhibiting peptide blocks fibroblast growth factor 2 activity by binding to the heparan sulfate chains of CD44. *Cancer Research*, 65:10494-10501.

I

Ido,H., Harada,K., Yagi,Y., and Sekiguchi,K. (2006): Probing the integrin-binding site within the globular domain of laminin-511 with the function-blocking monoclonal antibody 4C7. *Matrix Biol.*, 25:112-117.

Indyk,J.A., Chen,Z.L., Tsirka,S.E., and Strickland,S. (2003): Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience*, 116:359-371.

Ireland,H., Kemp,R., Houghton,C., Howard,L., Clarke,A.R., Sansom,O.J., and Winton,D.J. (2004): Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology*, 126:1236-1246.

J

Jenny,M., Uhl,C., Roche,C., Duluc,I., Guillermin,V., Guillemot,F., Jensen,J., Kedinger,M., and Gradwohl,G. (2002): Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.*, 21:6338-6347.

Jones,S.E. and Jomary,C. (2002): Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays*, 24:811-820.

K

Kadoya,Y., Mochizuki,M., Nomizu,M., Sorokin,L., and Yamashina,S. (2003): Role for laminin-alpha5 chain LG4 module in epithelial branching morphogenesis. *Dev Biol*, 263:153-164.

Kanai-Azuma,M., Kanai,Y., Gad,J.M., Tajima,Y., Taya,C., Kurohmaru,M., Sanai,Y., Yonekawa,H., Yazaki,K., Tam,P.P., and Hayashi,Y. (2002): Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*, 129:2367-2379.

Kandel,E.S. and Hay,N. (1999): The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp.Cell Res.*, 253:210-229.

Katz,J.P., Perreault,N., Goldstein,B.G., Lee,C.S., Labosky,P.A., Yang,V.W., and Kaestner,K.H. (2002): The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, 129:2619-2628.

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

Kedinger,M., Freund,J.-N., Launay,J.F., and Simon-Assmann,P. (2000): Cell interactions through the basement membrane in intestinal development and differentiation. In: *Development of the Gastrointestinal Tract*, edited by I.R.Sanderson, et al, pp. 83-102. B.C.Decker Inc., London.

Kerr,D. (2003): Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 3:615-622.

- Kikkawa,Y. and Miner,J.H. (2005): Review: Lutheran/B-CAM: a laminin receptor on red blood cells and in various tissues. *Connect.Tissue Res.*, 46:193-199.
- Kikkawa,Y. and Miner,J.H. (2006): Molecular dissection of laminin alpha 5 in vivo reveals separable domain-specific roles in embryonic development and kidney function. *Dev.Biol.*, 296:265-277.
- Kikkawa,Y., Moulson,C.L., Virtanen,I., and Miner,J.H. (2002): Identification of the binding site for the Lutheran blood group glycoprotein on laminin alpha 5 through expression of chimeric laminin chains in vivo. *J.Biol.Chem.*, 277:44864-44869.
- Kikkawa,Y., Sanzen,N., and Sekiguchi,K. (1998): Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin alpha3 beta1. *J.Biol.Chem.*, 273:15854-15859.
- Kikkawa,Y., Virtanen,I., and Miner,J.H. (2003): Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane. *J.Cell Biol*, 161:187-196.
- Kim,B.M., Mao,J., Taketo,M.M., and Shivdasani,R.A. (2007): Phases of canonical Wnt signaling during the development of mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 133:529-538.
- Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87:159-170.
- Klaffky,E., Williams,R., Yao,C.C., Ziober,B., Kramer,R., and Sutherland,A. (2001): Trophoblast-specific expression and function of the integrin alpha 7 subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev.Biol.*, 239:161-175.
- Kondo,T., Dolle,P., Zakany,J., and Duboule,D. (1996): Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development*, 122:2651-2659.
- Korinek,V., Barker,N., Willert,K., Molenaar,M., Roose,J., Wagenaar,G., Markman,M., Lamers,W., Destree,O., and Clevers,H. (1998): Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol.Cell Biol.*, 18:1248-1256.
- Kroviarski,Y., El Nemer,W., Gane,P., Rahuel,C., Gauthier,E., Lecomte,M.C., Cartron,J.P., Colin,Y., and Le Van,K.C. (2004): Direct interaction between the Lu/B-CAM adhesion glycoproteins and erythroid spectrin. *Br.J.Haematol.*, 126:255-264.
- Kumar,C.C. (1998): Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, 17:1365-1373.

L

- Langenbach,K.J. and Rando,T.A. (2002): Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve*, 26:644-653
- Laprise,P., Chailier,P., Houde,M., Beaulieu,J.F., Boucher,M.J., and Rivard,N. (2002): Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J.Biol.Chem.*, 277:8226-8234.
- Larue,L. and Bellacosa,A. (2005): Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24:7443-7454.

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

Levin,J.M., El Andalousi,R.A., Dainat,J., Reyne,Y., and Bacou,F. (2001): SFRP2 expression in rabbit myogenic progenitor cells and in adult skeletal muscles. *J.Muscle Res.Cell Motil.*, 22:361-369.

Li,J., Tzu,J., Chen,Y., Zhang,Y.P., Nguyen,N.T., Gao,J., Bradley,M., Keene,D.R., Oro,A.E., Miner,J.H., and Marinkovich,M.P. (2003a): Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J.*, 22:2400-2410.

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

Lin,L. and Kurpakus-Wheater,M. (2002): Laminin alpha5 chain adhesion and signaling in conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 43:2615-2621.

Lorentz,O., Duluc,I., Arcangelis,A.D., Simon-Assmann,P., Kedinger,M., and Freund,J.N. (1997): Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J.Cell Biol.*, 139:1553-1565.

Lotz,M.M., Nusrat,A., Madara,J.L., Ezzell,R., Wewer,U.M., and Mercurio,A.M. (1997): Intestinal epithelial restitution. Involvement of specific laminin isoforms and integrin laminin receptors in wound closure of a transformed model epithelium. *Am.J.Pathol.*, 150:747-760.

Lowe,L.A., Yamada,S., and Kuehn,M.R. (2001): Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development*, 128:1831-1843.

Luetkeke,N.C., Qiu,T.H., Peiffer,R.L., Oliver,P., Smithies,O., and Lee,D.C. (1993): TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, 73:263-278.

M

Maatta,M., Virtanen,I., Burgeson,R., and Autio-Harmanen,H. (2001): Comparative analysis of the distribution of laminin chains in the basement membranes in some malignant epithelial tumors: the alpha1 chain of laminin shows a selected expression pattern in human carcinomas. *J.Histochem.Cytochem.*, 49:711-726.

Makino,M., Okazaki,I., Kasai,S., Nishi,N., Bougaeva,M., Weeks,B.S., Otaka,A., Nielsen,P.K., Yamada,Y., and Nomizu,M. (2002): Identification of cell binding sites in the laminin alpha5-chain G domain. *Exp.Cell Res.*, 277:95-106.

Meng,Z.X., Sun,J.X., Ling,J.J., Lv,J.H., Zhu,D.Y., Chen,Q., Sun,Y.J., and Han,X. (2006): Prostaglandin E2 regulates Foxo activity via the Akt pathway: implications for pancreatic islet beta cell dysfunction. *Diabetologia*, 49:2959-2968.

Miner,J.H. (2008): Laminins and their roles in mammals. *Microsc.Res.Tech.*,

Miner,J.H., Cunningham,J., and Sanes,J.R. (1998): Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J.Cell Biol.*, 143:1713-1723.

Miner,J.H. and Li,C. (2000): Defective glomerulogenesis in the absence of laminin α 5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol*, 217:278-289.

Miner,J.H., Li,C., Mudd,J.L., Go,G., and Sutherland,A.E. (2004): Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development*, 131:2247-2256.

Mirsky,R. and Jessen,K.R. (1996): Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 6:89-96.

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

Moulson,C.L., Li,C., and Miner,J.H. (2001): Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, and transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo. *Dev.Dyn.*, 222:101-114.

N

Nadiri,A., Kuchler-Bopp,S., Haikel,Y., and Lesot,H. (2004): Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J.Histochem.Cytochem.*, 52:103-112.

Natarajan,D. and Pachnis,V. (2000): Development of the enteric nervous system. In: *Development of the Gastrointestinal Tract*, edited by I.R.Sanderson, et al, pp. 197-210. B.C. Decker Inc., Hamilton,London,StLouis.

Nguyen,N.M., Kelley,D.G., Schlueter,J.A., Meyer,M.J., Senior,R.M., and Miner,J.H. (2005): Epithelial laminin [alpha]5 is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung. *Developmental biology*, 282:111-125.

Nguyen,N.M., Miner,J.H., Pierce,R.A., and Senior,R.M. (2002): Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Dev.Biol.*, 246:231-244.

Nielsen,P.K., Gho,Y.S., Hoffman,M.P., Watanabe,H., Makino,M., Nomizu,M., and Yamada,Y. (2000): Identification of a major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin alpha 5 chain. *J.Biol.Chem.*, 275:14517-14523.

Nielsen,P.K. and Yamada,Y. (2001): Identification of cell-binding sites on the Laminin alpha 5 N-terminal domain by site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.*, 276:10906-10912.

O

Orian-Rousseau,V., Aberdam,D., Rousselle,P., Messent,A., Gavrilovic,J., Meneguzzi,G., Kedinger,M., and Simon-Assmann,P. (1998): Human colonic cancer cells synthesize and adhere to laminin-5. Their adhesion to laminin-5 involves multiple receptors among which is integrin alpha2beta1. *J.Cell Sci.*, 111 (Pt 14):1993-2004.

P

Paez,M.C., Gonzalez,M.J., Serrano,N.C., Shoenfeld,Y., and Anaya,J.M. (2007): Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. *Autoimmunity*, 40:83-94.

Parikh,D.H., Tam,P.K., Lloyd,D.A., Van Velzen,D., and Edgar,D.H. (1992a): Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease. *J.Pediatr.Surg.*, 27:991-995.

Parikh,D.H., Tam,P.K., Van Velzen,D., and Edgar,D. (1992b): Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, 102:1236-1241.

Parsons,S.F., Mallinson,G., Holmes,C.H., Houlihan,J.M., Simpson,K.L., Mawby,W.J., Spurr,N.K., Warne,D., Barclay,A.N., and Anstee,D.J. (1995): The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92:5496-5500.

Patton,B.L. (2000): Laminins of the neuromuscular system. *Microsc.Res.Tech.*, 51:247-261.

Patton,B.L., Connolly,A.M., Martin,P.T., Cunningham,J.M., Mehta,S., Pestronk,A., Miner,J.H., and Sanes,J.R. (1999): Distribution of ten laminin chains in dystrophic and regenerating muscles. *Neuromuscular Disorders*, 9:423-433.

Pinto,D., Gregorieff,A., Begthel,H., and Clevers,H. (2003): Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.*, 17:1709-1713.

Pistritto,G., Jost,M., Srinivasula,S.M., Baffa,R., Poyet,J.L., Kari,C., Lazebnik,Y., Rodeck,U., and Alnemri,E.S. (2002): Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death.Differ.*, 9:995-1006.

Pitera,J.E., Smith,V.V., Woolf,A.S., and Milla,P.J. (2001): Embryonic gut anomalies in a mouse model of retinoic acid-induced caudal regression syndrome - Delayed gut looping, rudimentary cecum, and anorectal anomalies. *American Journal of Pathology*, 159:2321-2329.

Pouliot,N., Nice,E.C., and Burgess,A.W. (2001): Laminin-10 mediates basal and EGF-stimulated motility of human colon carcinoma cells via alpha(3)beta(1) and alpha(6)beta(4) integrins. *Exp.Cell Res.*, 266:1-10.

Puri,P., Ohshiro,K., and Wester,T. (1998): Hirschsprung's disease: a search for etiology. *Semin.Pediatr.Surg.*, 7:140-147.

Pyke,C., Salo,S., Ralfkiaer,E., Romer,J., Dano,K., and Tryggvason,K. (1995): Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 55:4132-4139.

R

Rahuel,C., Colin,Y., Goossens,D., Gane,P., El Nemer,W., Cartron,J.P., and Le Van,K.C. (1999): Characterization of a mouse liminin receptor gene homologous to the human blood group Lutheran gene. *Immunogenetics*, 50:271-277.

Ramalho-Santos,M., Melton,D.A., and McMahon,A.P. (2000): Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127:2763-2772.

Rebustini,I.T., Patel,V.N., Stewart,J.S., Layvey,A., Georges-Labouesse,E., Miner,J.H., and Hoffman,M.P. (2007): Laminin alpha 5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta 1 integrin signaling. *Developmental biology*, 308:15-29.

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

Rothman,T.P., Chen,J., Howard,M.J., Costantini,F., Schuchardt,A., Pachnis,V., and Gershon,M.D. (1996): Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of ls/ls, but not c-ret ^{-/-} mice. *Dev.Biol.*, 178:498-513.

Roy,H.K., Olusola,B.F., Clemens,D.L., Karolski,W.J., Ratashak,A., Lynch,H.T., and Smyrk,T.C. (2002): AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23:201-205.

S

Sancho,E., Batlle,E., and Clevers,H. (2004): Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 20:695-723.

Sandgren,E.P., Lueteteke,N.C., Palmiter,R.D., Brinster,R.L., and Lee,D.C. (1990): Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 61:1121-1135.

Sasaki,T. and Timpl,R. (2001): Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett.*, 509:181-185.

Schreider,C., Peignon,G., Thenet,S., Chambaz,J., and Pincon-Raymond,M. (2002): Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin--actin complexes. *J.Cell Sci.*, 115:543-552.

Shannon,M.B., Patton,B.L., Harvey,S.J., and Miner,J.H. (2006): A Hypomorphic Mutation in the Mouse Laminin {alpha}5 Gene Causes Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*, 17:1913-1922.

Siler,U., Rousselle,P., Muller,C.A., and Klein,G. (2002): Laminin gamma2 chain as a stromal cell marker of the human bone marrow microenvironment. *Br.J.Haematol.*, 119:212-220.

Simo,P., Simon-Assmann,P., Arnold,C., and Kedinger,M. (1992): Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells. *J.Cell Sci.*, 101 (Pt 1):161-171.

Simo,P., Simon-Assmann,P., Bouziges,F., Leberquier,C., Kedinger,M., Ekblom,P., and Sorokin,L. (1991): Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development*, 112:477-487.

Simon-Assmann,P., Bolcato-Bellemin,A.-L., Turck,N., Piccinni,S., Olsen,J., Launay,J.F., Lefebvre,O., and Kedinger,M. (2003): Basement membrane laminins in normal and pathological intestine. In: *Disease Progression and Carcinogenesis in the Gastrointestinal Tract*, edited by P.Johnstone, pp. 223-239. Kluwer Academic Publishers, London.

Simon-Assmann,P. and Kedinger,M. (2000): Interactions cellules épithéliales/cellules mésenchymateuses dans l'intestin. In: *Biologie et pathologie des épithéliums*, edited by C.Clerici, et al, pp. 255-266. Paris.

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

Simon-Assmann,P. and Kedinger,M. (1993): Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Seminars in Cell Biology*, 4:221-230.

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

Song,G., Ouyang,G., and Bao,S. (2005): The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J.Cell Mol.Med.*, 9:59-71.

T

Takada,Y., Ye,X., and Simon,S. (2007): The integrins. *Genome Biol.*, 8:215

Tan,C., Costello,P., Sanghera,J., Dominguez,D., Baulida,J., de Herreros,A.G., and Dedhar,S. (2001): Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 20:133-140.

Tani,T., Lehto,V.P., and Virtanen,I. (1999): Expression of laminins 1 and 10 in carcinoma cells and comparison of their roles in cell adhesion. *Experimental Cell Research*, 248:115-121.

Taraviras,S. and Pachnis,V. (1999): Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 9:321-327.

Teller,I.C. and Beaulieu,J.F. (2001): Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert.Rev.Mol.Med.*, 3:1-18.

Traber,P.G. (2000): Development of brush border enzyme activity. In: *Development of the Gastrointestinal Tract*, edited by I.R.Sanderson, et al, pp. 103-122. B.C. Decker Inc., Hamilton,London,StLouis.

Tsafrir,D., Bacolod,M., Selvanayagam,Z., Tsafrir,I., Shia,J., Zeng,Z., Liu,H., Krier,C., Stengel,R.F., Barany,F., Gerald,W.L., Paty,P.B., Domany,E., and Notterman,D.A. (2006): Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 66:2129-2137.

Tunggal,P., Smyth,N., Paulsson,M., and Ott,M.C. (2000): Laminins: Structure and genetic regulation. *Microscopy Research and Technique*, 51:214-227.

Turck,N., Gross,I., Gendry,P., Stutzmann,J., Freund,J.N., Kedinger,M., Simon-Assmann,P., and Launay,J.F. (2005): Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 303:494-503.

V

Vachon,P.H. and Beaulieu,J.F. (1995): Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am.J.Physiol*, 268:G857-G867

Vara,J.A., Casado,E., de Castro,J., Cejas,P., Belda-Iniesta,C., and Gonzalez-Baron,M. (2004): PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat.Rev.*, 30:193-204.

Velling,T., Tiger,C.F., Ekblom,P., and Gullberg,D. (1999): Laminin alpha chains in colon carcinoma cell lines: detection of a truncated laminin alpha1 mRNA in Caco-2 cells. *Exp.Cell Res.*, 248:627-633.

Vivanco,I. and Sawyers,C.L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 2:489-501.

W

Warot,X., Fromental-Ramain,C., Fraulob,V., Chambon,P., and Dolle,P. (1997): Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development*, 124:4781-4791.

Wautier,M.P., El Nemer,W., Gane,P., Rain,J.D., Cartron,J.P., Colin,Y., Van Kim,C., and Wautier,J.L. (2007): Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha(5) chain and Lu/BCAM. *Blood*, 110:894-901.

Wiginton,D.A. (2000): Gene regulation: the key to intestinal development. In: *Development of the Gastrointestinal Tract*, edited by I.R.Sanderson, et al, pp. 13-36. B.C. Decker Inc., Hamilton,London,StLouis.

Williamson,R.A., Henry,M.D., Daniels,K.J., Hrstka,R.F., Lee,J.C., Sunada,Y., Ibraghimov-Beskrovnyaya,O., and Campbell,K.P. (1997): Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum.Mol.Genet.*, 6:831-841.

Winder,S.J. (2001): The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem.Sci.*, 26:118-124.

Wolgemuth,D.J., Behringer,R.R., Mostoller,M.P., Brinster,R.L., and Palmiter,R.D. (1989): Transgenic mice overexpressing the mouse homoeobox-containing gene Hox-1.4 exhibit abnormal gut development. *Nature*, 337:464-467.

Wu,C., Keightley,S.Y., Leung-Hagesteijn,C., Radeva,G., Coppolino,M., Goicoechea,S., McDonald,J.A., and Dedhar,S. (1998): Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J.Biol.Chem.*, 273:528-536.

X

Xu,X., Sakon,M., Nagano,H., Hiraoka,N., Yamamoto,H., Hayashi,N., Dono,K., Nakamori,S., Umeshita,K., Ito,Y., Matsuura,N., and Monden,M. (2004): Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol.Rep.*, 11:25-32.

Y

Yin,Y., Kikkawa,Y., Mudd,J.L., Skarnes,W.C., Sanes,J.R., and Miner,J.H. (2003): Expression of laminin chains by central neurons: analysis with gene and protein trapping techniques. *Genesis*, 36:114-127.

Yu,H. and Talts,J.F. (2003): Beta1 integrin and alpha-dystroglycan binding sites are localized to different laminin-G-domain-like (LG) modules within the laminin alpha5 chain G domain. *Biochem.J.*, 371:289-299.

Yurchenco,P.D., Quan,Y., Colognato,H., Mathus,T., Harrison,D., Yamada,Y., and O'Rear,J.J. (1997): The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94:10189-10194.

ANNEXES

**Annexe 1 : Liste des gènes sur-exprimés dans au moins 2 échantillons Lama5 -/- sur 4 analysés
(première étape de sélection)**

Gène	Accession number		origine	
Tnfsf9	Mm.41171	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9"	IMAGE	385539
Hlx	Mm.1347	H2.0-like homeo box gene"	IMAGE	423176
Kcnn4	Mm.9911	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4"	IMAGE	425427
Deaf1	Mm.28392	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila)"	IMAGE	390207
Ccnb1-rs1	Mm.258385	cyclin B1, related sequence 1"	IMAGE	385214
Sin3b	Mm.2137	transcriptional regulator, SIN3B (yeast)"	IMAGE	425413
Cd34	Mm.29798	CD34 antigen"	IMAGE	387352
Clta	Mm.198817	clathrin, light polypeptide (Lca)"	IMAGE	385449
Rara	Mm.103336	retinoic acid receptor, alpha"	IMAGE	439287
Bcl2l	Mm.3882	Bcl2-like"	IMAGE	422063
Mapk14	Mm.4437	mitogen activated protein kinase 14"	IMAGE	388597
Mad3	Mm.20350	Max dimerization protein 3"	IMAGE	427414
Klf4	Mm.4325	Kruppel-like factor 4 (gut)"	IMAGE	422208
Kifc1	Mm.197684	kinesin family member C1"	IMAGE	388628
	Mm.40966	Mus musculus adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230309J24 product:hypothetical Zinc finger, C2H2 type containing protein, full insert sequence."	IMAGE	391488
Cryaa	Mm.1228	crystallin, alpha A"	IMAGE	437330
Heyl	Mm.103615	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like"	IMAGE	354111
Csf1	Mm.795	colony stimulating factor 1 (macrophage)"	IMAGE	422914
Prkcq	Mm.2921	protein kinase C, theta"	IMAGE	424857
Pitx2	Mm.1385	paired-like homeodomain transcription factor 2"	IMAGE	371701
Lhx1	Mm.4965	LIM homeobox protein 1"	IMAGE	421587
Ppp2r1a	Mm.1034	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform"	IMAGE	421657
Hmgb3	Mm.340	high mobility group box 3"	IMAGE	423316
Klf1	Mm.4847	Kruppel-like factor 1 (erythroid)"	IMAGE	372718
Elavl3	Mm.3477	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)"	IMAGE	472826
Rpa2	Mm.2870	replication protein A2"	IMAGE	608017
Sema4d	Mm.33903	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin)	IMAGE	423348
Sema4a	Mm.22061	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin)	IMAGE	573186
In multiple clusters			IMAGE	642620
Mapk9	Mm.68933	mitogen activated protein kinase 9"	IMAGE	372893
Cul3	Mm.12665	cullin 3"	IMAGE	598918
Flt3	Mm.194	FMS-like tyrosine kinase 3"	IMAGE	576267
Pscd2	Mm.19097	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 2"	IMAGE	602691
Rpo2tc1	Mm.41746	RNA polymerase II transcriptional coactivator"	IMAGE	420028
Rpo2tc1	Mm.41746	RNA polymerase II transcriptional coactivator"	IMAGE	722427
Hba-x	Mm.141758	hemoglobin X, alpha-like embryonic chain in Hba complex"	IMAGE	568123
Ntrk2	Mm.3993	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2"	IMAGE	1177645
Tal1	Mm.3102	T-cell acute lymphocytic leukemia 1"	IMAGE	789979
H2-Eb1	Mm.22564	histocompatibility 2, class II antigen E beta"	IMAGE	2646494
Scn10a	Mm.42141	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha polypeptide"	IMAGE	1315192
Syt4	Mm.233846	synaptotagmin 4"	IMAGE	4481416
Pik3cd	Mm.153755	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide"	IMAGE	1314018
Bcl10	Mm.28782	B-cell leukemia/lymphoma 10"	IMAGE	1379061
Hmgb1	Mm.16421	high mobility group box 1"	IMAGE	1004994

Il11ra2	Mm.193451	interleukin 11 receptor, alpha chain 2"	IMAGE	1349690
Eif1a	Mm.143141	eukaryotic translation initiation factor 1A"	IMAGE	778348
Alox12e	Mm.1122	arachidonate lipoxygenase, epidermal"	IMAGE	2646874
Alox12e	Mm.1122	arachidonate lipoxygenase, epidermal"	IMAGE	607858
Arf5	Mm.4996	ADP-ribosylation factor 5"	IMAGE	2645353
H2-K	Mm.16771	histocompatibility 2, K region"	IMAGE	890636
Meox2	Mm.153716	mesenchyme homeobox 2"	IMAGE	847431
Data not found			IMAGE	672045
Top3a	Mm.10708	topoisomerase (DNA) III alpha"	IMAGE	734931
Sypl	Mm.45146	synaptophysin-like protein"	IMAGE	920449
Gprk6	Mm.10193	G protein-coupled receptor kinase 6"	IMAGE	947870
Tcrb-V8.3	Mm.138641	T-cell receptor beta, variable 8.3"	IMAGE	1430414
Il4	Mm.371	interleukin 4"	USER004	pp117
Uox	Mm.10865	urate oxidase"	IMAGE	1482831
inosine moP			USER003	
Apoa2	Mm.43677	apolipoprotein A-II"	IMAGE	407756
Il17r	Mm.4481	interleukin 17 receptor"	USER004	pp83
Madh2	Mm.2334	MAD homolog 2 (Drosophila)"	IMAGE	567853
Cnn3	Mm.22171	calponin 3, acidic"	IMAGE	1497946
Trp63	Mm.20894	transformation related protein 63"	IMAGE	1510577
ApoE	Mm.156335	apolipoprotein E"	IMAGE	1885741
Gnb2-rs1	Mm.5305	guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1"	IMAGE	1887673
Gata3	Mm.606	GATA binding protein 3"	IMAGE	1209833
Tnfrsf9	Mm.198677	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9"	IMAGE	1497753
Mor1	Mm.21743	malate dehydrogenase, mitochondrial"	IMAGE	539321
PHC ETA			USER003	
Il13ra1	Mm.24208	interleukin 13 receptor, alpha 1"	USER004	pp73
Igfbp3	Mm.29254	insulin-like growth factor binding protein 3"	IMAGE	555520
Igf2bp3	Mm.18496	insulin-like growth factor 2, binding protein 3"	IMAGE	538155
Hspa5	Mm.918	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)"	IMAGE	1885307
ACTG1 (Hs)			CTRL	
Arha2	Mm.757	ras homolog gene family, member A2"	IMAGE	438359
Eif2b	Mm.140365	eukaryotic translation initiation factor 2B"	IMAGE	425503
1110002L01Rik	Mm.36793	RIKEN cDNA 1110002L01 gene"	IMAGE	375359
Pcsk5	Mm.3401	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5"	IMAGE	439378
Hspd1	Mm.1777	heat shock protein 1 (chaperonin)"	IMAGE	537335
Rad9	Mm.193035	RAD9 homolog (S. pombe)"	IMAGE	437513
Prrx2	Mm.1802	paired related homeobox 2"	IMAGE	420691
Rgs19	Mm.20156	regulator of G-protein signaling 19"	IMAGE	423076
Mg29	Mm.20942	mitsugumin 29"	IMAGE	572639
Mapt	Mm.1287	microtubule-associated protein tau"	IMAGE	551150
Nbl1	Mm.9404	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1"	IMAGE	423144
Cbx5	Mm.28003	chromobox homolog 5 (Drosophila HP1a)"	IMAGE	538257
2900026H06Rik	Mm.151483	RIKEN cDNA 2900026H06 gene"	IMAGE	420984
Apoc1	Mm.182440	apolipoprotein C-I"	IMAGE	423556
Cxcl12	Mm.465	chemokine (C-X-C motif) ligand 12"	IMAGE	659017
E2f5	Mm.379	E2F transcription factor 5"	IMAGE	585020
Sox4	Mm.18789	SRY-box containing gene 4"	IMAGE	608788
Tubb5	Mm.1703	tubulin, beta 5"	IMAGE	424335
Dlx5	Mm.4873	distal-less homeobox 5"	IMAGE	427483
Itpr3	Mm.26945	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3"	IMAGE	479269
Kif1a	Mm.4762	kinesin family member 1A"	IMAGE	367607
	Mm.218722	Mus musculus, Similar to maternal G10 transcript, clone IMAGE:3594956, mRNA"	IMAGE	425080
Ebf1	Mm.4366	early B-cell factor 1"	IMAGE	355614
	Mm.23130	ESTs"	IMAGE	426959
Map2k3	Mm.18494	mitogen activated protein kinase kinase 3"	IMAGE	439023
2610029D06Rik	Mm.41554	RIKEN cDNA 2610029D06 gene"	IMAGE	427057

MGC18735	Mm.100403	hypothetical protein MGC18735"	IMAGE	636896
Prim1	Mm.2903	DNA primase, p49 subunit"	IMAGE	521959
Dermo1	Mm.9474	dermis expressed 1"	IMAGE	370938
Pex6	Mm.41268	peroxisomal biogenesis factor 6"	IMAGE	1499053
Smarca2	Mm.181163	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2"	IMAGE	403171
Gnai2	Mm.196464	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2"	IMAGE	406868
Hbb-y	Mm.35830	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain"	IMAGE	465646
Prkdc	Mm.71	protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide"	IMAGE	524350
Mre11a	Mm.25544	meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)"	IMAGE	524361
Ldb3	Mm.29733	LIM domain binding 3"	IMAGE	400512
Epha1	Mm.133330	Eph receptor A1"	IMAGE	521240
Rab33a	Mm.2015	RAB33A, member of RAS oncogene family"	IMAGE	406177
Mknk1	Mm.206467	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1"	IMAGE	484284
Rpo2tc1	Mm.41746	RNA polymerase II transcriptional coactivator"	IMAGE	420028
Ccl22	Mm.12895	chemokine (C-C motif) ligand 22"	IMAGE	574885
Nr4a3	Mm.101224	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3"	IMAGE	317263
Dlk1	Mm.157069	delta-like 1 homolog (Drosophila)"	IMAGE	318837
Rasgrp2	Mm.20884	RAS, guanyl releasing protein 2"	IMAGE	478922
Adora2a	Mm.153916	adenosine A2a receptor"	IMAGE	330989
Rrm1	Mm.656	ribonucleotide reductase M1"	IMAGE	480012
Tnfrsf10b	Mm.193430	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b"	IMAGE	1345564
Chek1	Mm.16753	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)"	IMAGE	944695
Ltb	Mm.1715	lymphotoxin B"	USER004	pp147
Wars	Mm.38433	tryptophanyl-tRNA synthetase"	IMAGE	616724
Dvl1	Mm.3400	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)"	IMAGE	597617
Gata2	Mm.1391	GATA binding protein 2"	IMAGE	657678
Tdo2	Mm.21545	tryptophan 2,3-dioxygenase"	IMAGE	1431136
Kcnk2	Mm.31570	potassium channel, subfamily K, member 2"	IMAGE	1958437
Sfrp2	Mm.19155	secreted frizzled-related sequence protein 2"	IMAGE	368879
Casp14	Mm.20940	caspase 14"	IMAGE	1499007
Itgb4	Mm.21117	integrin beta 4"	IMAGE	337221
Fgf2	Mm.57094	fibroblast growth factor 2"	IMAGE	1447251
Ifngr	Mm.549	interferon gamma receptor"	IMAGE	2648386
Hsd3b4	Mm.14309	hydroxysteroid dehydrogenase-4, delta<5>-3-beta"	IMAGE	1970780
Ii	Mm.258212	Ia-associated invariant chain"	IMAGE	2646079
Pfkfb2	Mm.257993	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2"	IMAGE	349826
Nfkb1	Mm.3420	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105"	IMAGE	1447327
Pte2b-pending	Mm.219001	peroxisomal acyl-CoA thioesterase 2B"	IMAGE	407886
T F INSULINE			USER003	
Bcar1	Mm.3758	breast cancer anti-estrogen resistance 1"	IMAGE	2598949
Itgav	Mm.4427	integrin alpha V"	IMAGE	1125496
Abcc5	Mm.20845	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5"	IMAGE	987788
Cbl	Mm.246818	Casitas B-lineage lymphoma"	IMAGE	1398841
Csf2ra	Mm.156264	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)"	USER004	pp17
Slc4a3	Mm.5053	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3"	IMAGE	1152297
NLSlacZ			CTRL	
Pik3c2g	Mm.10301	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide"	IMAGE	1617047
CystProt (plant)			CTRL	
IFNGR2			USER003	
Maff	Mm.86646	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)"	IMAGE	387565
Gla	Mm.1114	galactosidase, alpha"	IMAGE	617018
Trp53	Mm.222	transformation related protein 53"	IMAGE	576063
Erh	Mm.21952	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)"	IMAGE	427193
Msc	Mm.5820	musculin"	IMAGE	640142

Abl1	Mm.1318	v-abl Abelson murine leukemia oncogene 1"	IMAGE	603405
Csrp2	Mm.2020	cysteine-rich protein 2"	IMAGE	408514
Ywhah	Mm.3308	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide"	IMAGE	468047
LOC230904	Mm.23290	hypothetical protein LOC230904"	IMAGE	355415
Gng5	Mm.140804	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 subunit"	IMAGE	573253
Ldb1	Mm.4524	LIM domain binding 1"	IMAGE	372304
Prkar1b	Mm.9334	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta"	IMAGE	408750
Itgam	Mm.4967	integrin alpha M"	IMAGE	483591
Rgs5	Mm.20954	regulator of G-protein signaling 5"	IMAGE	386242
Runx2	Mm.4509	runt related transcription factor 2"	IMAGE	331565
Tlr4	Mm.85343	toll-like receptor 4"	IMAGE	618488
Mapkapk2	Mm.29725	MAP kinase-activated protein kinase 2"	IMAGE	478653
Data not found			IMAGE	57294
Msx1	Mm.870	homeo box, msh-like 1"	IMAGE	803727
Clock	Mm.3552	circadian locomoter output cycles kaput"	IMAGE	920225
Ppy	Mm.1269	pancreatic polypeptide"	IMAGE	1177097
Per2	Mm.8471	period homolog 2 (Drosophila)"	IMAGE	1348887
Lig3	Mm.1411	ligase III, DNA, ATP-dependent"	IMAGE	778550
Pak3	Mm.3392	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3"	IMAGE	761330
Actb	Mm.297	actin, beta, cytoplasmic"	IMAGE	1209347
Ppp1r3c	Mm.24724	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C"	IMAGE	1262531
Mif	Mm.2326	macrophage migration inhibitory factor"	IMAGE	634910
Prkag1	Mm.6670	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit"	IMAGE	2136735
Nr4a1	Mm.119	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1"	IMAGE	1265548
Myod1	Mm.1526	myogenic differentiation 1"	IMAGE	1094218
Mbp	Mm.2992	myelin basic protein"	IMAGE	315274
Fzd2	Mm.36416	frizzled homolog 2 (Drosophila)"	IMAGE	406116
Slc2a1	Mm.21002	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1"	IMAGE	463230
Eng	Mm.4851	endoglin"	USER004	pp33
Ubb	Mm.235	ubiquitin B"	IMAGE	1886361
JAK 3			USER003	
Lamr1	Mm.4071	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)"	IMAGE	1886017
Il12a	Mm.103783	interleukin 12a"	USER004	pp59
Sc5d	Mm.13081	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisae)"	IMAGE	1889201
Eef1a1	Mm.196614	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1"	IMAGE	1765806
TGF BETA 1			USER003	
Il2rb			USER004	pp103
Nfkbie	Mm.57043	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon"	IMAGE	2803298
AI195443	Mm.157103	expressed sequence AI195443"	IMAGE	1885992

Annexe 2: Liste des gènes sous-exprimés dans au moins 2 échantillons d'intestins Lama5 -/- sur 4 analysés (première étape de sélection)

Gène	Accession number		origine	
Rfxank	Mm.161167	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein"	IMAGE	641476
Hmgn1	Mm.2756	high mobility group nucleosomal binding domain 1"	IMAGE	352155
8030489C12Rik	Mm.128834	RIKEN cDNA 8030489C12 gene"	IMAGE	619213
Nkx2-2	Mm.4701	NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)"	IMAGE	480100
Ywhaz	Mm.3360	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide"	IMAGE	580090
Ccl9	Mm.2271	chemokine (C-C motif) ligand 9"	IMAGE	620156
Cryaa	Mm.1228	crystallin, alpha A"	IMAGE	316842
Csrp2	Mm.2020	cysteine-rich protein 2"	IMAGE	314603
Amacr	Mm.2787	alpha-methylacyl-CoA racemase"	IMAGE	3370010
Es2el	Mm.10094	expressed sequence 2 embryonic lethal"	IMAGE	318785
Rnf4	Mm.21281	ring finger protein 4"	IMAGE	581764
Ldb3	Mm.29733	LIM domain binding 3"	IMAGE	419260
Ldb3	Mm.29733	LIM domain binding 3"	IMAGE	400512
Dad1	Mm.2547	defender against cell death 1"	IMAGE	580954
Data not found			IMAGE	3978162
Mapk1	Mm.196581	mitogen activated protein kinase 1"	IMAGE	808744
Limk2	Mm.42927	LIM motif-containing protein kinase 2"	IMAGE	1366070
Np15	Mm.30084	nuclear protein 15.6"	IMAGE	891526
A630031M04Rik	Mm.227621	RIKEN cDNA A630031M04 gene"	IMAGE	974426
Slc8a1	Mm.4211	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1"	IMAGE	1210683
4833412C19Rik	Mm.60219	RIKEN cDNA 4833412C19 gene"	IMAGE	651269
Sncg	Mm.22231	synuclein, gamma"	IMAGE	963190
Rnf12	Mm.44069	ring finger protein 12"	IMAGE	961788
Nr1i3	Mm.3077	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3"	IMAGE	693202
Data not found			IMAGE	921814
Chk	Mm.5262	choline kinase"	IMAGE	820806
Ranbp2	Mm.142730	RAN binding protein 2"	IMAGE	791086
Tcl1b1	Mm.27538	T-cell leukemia/lymphoma 1B, 1"	IMAGE	791486
Pparbp	Mm.12926	peroxisome proliferator activated receptor binding protein"	IMAGE	1277552
Ctsc	Mm.684	cathepsin C"	IMAGE	1450646
Prss25	Mm.21880	protease, serine, 25"	IMAGE	692768
Pitpnb	Mm.200516	phosphatidylinositol transfer protein, beta"	IMAGE	1261081
Pitpn	Mm.3128	phosphatidylinositol transfer protein"	IMAGE	696533
Hsp105	Mm.34828	heat shock protein"	IMAGE	2182728
Prkag1	Mm.6670	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit"	IMAGE	2136735
Csf1	Mm.795	colony stimulating factor 1 (macrophage)"	USER004	pp23
Ndr1	Mm.4063	N-myc downstream regulated 1"	NIA15K	H3031C12
Mafb	Mm.67919	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)"	IMAGE	1970146
Klf13	Mm.41170	Kruppel-like factor 13"	IMAGE	1446590
4833412C19Rik	Mm.60219	RIKEN cDNA 4833412C19 gene"	IMAGE	651269
STAT5a			USER003	
Msc	Mm.5820	musculin"	IMAGE	2076585

Dvl2	Mm.5114	dishevelled 2, dsh homolog (Drosophila)"	IMAGE	445346
Csnk2a1-rs4	Mm.23692	casein kinase II, alpha 1 related sequence 4"	IMAGE	1971824
Hspa5	Mm.918	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)"	IMAGE	1431906
Wnt10b	Mm.4709	wingless related MMTV integration site 10b"	IMAGE	439485
Tuba4	Mm.1155	tubulin, alpha 4"	IMAGE	1431172
Hoxa10	Mm.5	homeo box A10"	IMAGE	1971478
Lamp2	Mm.486	lysosomal membrane glycoprotein 2"	IMAGE	2236632
Hspa1a	Mm.196559	heat shock protein 1A"	IMAGE	1481997
Edg3	Mm.136736	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3"	IMAGE	961785
Fhl1	Mm.3126	four and a half LIM domains 1"	IMAGE	1498837
Cckar	Mm.3521	cholecystokinin A receptor"	IMAGE	2236400
Gna13	Mm.193925	guanine nucleotide binding protein, alpha 13"	IMAGE	1922531
Edg2	Mm.4772	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2"	IMAGE	557418
Ppp1cc	Mm.7793	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform"	IMAGE	2065081
Pex3	Mm.41300	peroxisomal biogenesis factor 3"	IMAGE	2099516
EST	Mm.33148	ESTs, Weakly similar to I48668 zinc finger protein 51 - mouse [M.musculus]"	IMAGE	2099535
Pps	Mm.1458	putative phosphatase"	IMAGE	1479453
Crat	Mm.20396	carnitine acetyltransferase"	IMAGE	2123733
Nfe2l2	Mm.1025	nuclear, factor, erythroid derived 2, like 2"	IMAGE	2192413
Sc5d	Mm.13081	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)"	IMAGE	1889201
Nsg1	Mm.7414	neuron specific gene family member 1"	IMAGE	658942
Map2k4	Mm.27491	mitogen activated protein kinase kinase 4"	IMAGE	1511522
Prdx2	Mm.42948	peroxiredoxin 2"	IMAGE	616314
Cd79a	Mm.1355	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)"	IMAGE	616856
Prim2	Mm.27705	DNA primase, p58 subunit"	IMAGE	573647
Lta4h	Mm.533	leukotriene A4 hydrolase"	IMAGE	3469333
Cryaa	Mm.1228	crystallin, alpha A"	IMAGE	350163
Calm1	Mm.34246	calmodulin 1"	IMAGE	474552
Gjb1	Mm.21198	gap junction membrane channel protein beta 1"	IMAGE	1431434
Pld2	Mm.2538	phospholipase D2"	IMAGE	3484141
Axin	Mm.23684	axin"	IMAGE	639463
Mte1-pending	Mm.45431	mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1"	IMAGE	2159006
Atp9b	Mm.104687	ATPas, class II, type 9B"	IMAGE	3498651
Faah	Mm.2915	fatty acid amide hydrolase"	IMAGE	2099253
Calm3	Mm.1147	calmodulin 3"	IMAGE	421574
Akt2	Mm.177194	thymoma viral proto-oncogene 2"	IMAGE	3464828
Crmp1	Mm.22695	collapsin response mediator protein 1"	IMAGE	467865
Asml3a-pending	Mm.2379	acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a"	IMAGE	1888917
Cxcl12	Mm.465	chemokine (C-X-C motif) ligand 12"	IMAGE	533003
Mbtps1	Mm.29791	membrane-bound transcription factor protease, site 1"	IMAGE	3482628
Cpt2	Mm.29499	carnitine palmitoyltransferase 2"	IMAGE	1514381
Icam1	Mm.25455	intercellular adhesion molecule"	IMAGE	2225487
Rgs7	Mm.7956	regulator of G protein signaling 7"	IMAGE	400795
Cap1	Mm.8687	adenylyl cyclase-associated CAP protein homolog 1 (S. cerevisiae, S. pombe)"	IMAGE	874778
Homer2	Mm.228	homer homolog 2 (Drosophila)"	IMAGE	975789
Zfp35	Mm.3297	zinc finger protein 35"	IMAGE	2648383

Ap1m2	Mm.22239	adaptor protein complex AP-1, mu 2 subunit"	IMAGE	851950
Kif5b	Mm.3380	kinesin family member 5B"	IMAGE	976407
Pde9a	Mm.10812	phosphodiesterase 9A"	IMAGE	1195541
Dpp4	Mm.1151	dipeptidylpeptidase 4"	IMAGE	751396
H2-K	Mm.16771	histocompatibility 2, K region"	IMAGE	1277167
Hmgcn2	Mm.911	high mobility group nucleosomal binding domain 2"	IMAGE	371160
Pnoc	Mm.16347	prepronociceptin"	IMAGE	367399
Stk2	Mm.7693	serine/threonine kinase 2"	IMAGE	572118
Sptlc1	Mm.240336	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1"	IMAGE	1922320
Calb1	Mm.354	calbindin-28K"	IMAGE	1972495
Degs	Mm.29648	degenerative spermatocyte homolog (Drosophila)"	IMAGE	2064826
Slc11a2	Mm.1304	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2"	IMAGE	3470490
Scp2	Mm.1779	sterol carrier protein 2, liver"	IMAGE	1431426
Kcnn4	Mm.9911	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4"	IMAGE	354693
Ly6a	Mm.8180	lymphocyte antigen 6 complex, locus A"	IMAGE	571043
Rbbp7	Mm.1603	retinoblastoma binding protein 7"	IMAGE	619049
Alas2	Mm.140509	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid"	IMAGE	459311
Stk11	Mm.29947	serine/threonine kinase 11"	IMAGE	935323
Rrm1	Mm.656	ribonucleotide reductase M1"	IMAGE	903218
Ddx5	Mm.19101	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 5"	IMAGE	575906
Gata3	Mm.606	GATA binding protein 3"	IMAGE	2225835
Mad111	Mm.27250	mitotic arrest deficient 1-like 1"	IMAGE	1092869
Rab3d	Mm.29968	RAB3D, member RAS oncogene family"	IMAGE	2645253
Epas1	Mm.1415	endothelial PAS domain protein 1"	IMAGE	1277801
Cd24a	Mm.6417	CD24a antigen"	IMAGE	520544
Rgl2	Mm.43777	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 2"	IMAGE	1225762
Anpep	Mm.4487	alanyl (membrane) aminopeptidase"	IMAGE	1165131
D18Ert240e	Mm.142498	DNA segment, Chr 18, ERATO Doi 240, expressed"	IMAGE	720075
Stk11	Mm.29947	serine/threonine kinase 11"	IMAGE	1447679
Hmgcs2	Mm.10633	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2"	IMAGE	1886037
	Mm.27563	Mus musculus 16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630047E15 product:unknown EST, full insert sequence."	NIA15K	H3064E09
Rxra	Mm.3470	retinoid X receptor alpha"	IMAGE	1450334
Pdlim1	Mm.5567	PDZ and LIM domain 1 (elfin)"	IMAGE	2076828
Ccna2	Mm.4189	cyclin A2"	IMAGE	876255
Bcl2l2	Mm.6967	Bcl2-like 2"	IMAGE	2300906
Dp1	Mm.21251	deleted in polyposis 1"	IMAGE	519819
Bmp1	Mm.27757	bone morphogenetic protein 1"	IMAGE	888627
Sla	Mm.7601	src-like adaptor"	IMAGE	642710
Stk25	Mm.28761	serine/threonine kinase 25 (yeast)"	IMAGE	2158843
Cetn2	Mm.24643	centrin 2"	IMAGE	1153140
Rab1	Mm.14530	RAB1, member RAS oncogene family"	IMAGE	1749923
5830471N16Rik	Mm.258520	RIKEN cDNA 5830471N16 gene"	IMAGE	944257
Casp14	Mm.20940	caspase 14"	IMAGE	607211

Casp7	Mm.35687	caspase 7"	IMAGE	1921165
Npy	Mm.154796	neuropeptide Y"	IMAGE	482891
Fabp1	Mm.22126	fatty acid binding protein 1, liver"	IMAGE	4194783
Fabp2	Mm.28398	fatty acid binding protein 2, intestinal"	IMAGE	482742
Apoa4	Mm.4533	apolipoprotein A-IV"	IMAGE	1097087
Scnn1g	Mm.35247	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma"	IMAGE	1278106
Apoa4	Mm.4533	apolipoprotein A-IV"	IMAGE	1106338
Apoa1	Mm.26743	apolipoprotein A-I"	IMAGE	1450596
Apoa1	Mm.26743	apolipoprotein A-I"	IMAGE	1887067
Hmgcs2	Mm.10633	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2"	IMAGE	1480574
Hmgcs2	Mm.10633	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2"	IMAGE	4195850
Hmgcs2	Mm.10633	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2"	IMAGE	1886037
Enpp1	Mm.27254	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1"	IMAGE	1481219
Prlr	Mm.2752	prolactin receptor"	IMAGE	2064824
Prlr	Mm.2752	prolactin receptor"	IMAGE	2182914
Ddx26	Mm.4173	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26"	IMAGE	1496623
Scp2	Mm.1779	sterol carrier protein 2, liver"	IMAGE	1450815
Scp2	Mm.1779	sterol carrier protein 2, liver"	IMAGE	2921961
Tfdp1	Mm.925	transcription factor Dp 1"	IMAGE	582780
In multiple clusters			IMAGE	1482331
In multiple clusters			IMAGE	1891212
In multiple clusters			IMAGE	1890901
In multiple clusters			IMAGE	1969511
In multiple clusters			IMAGE	1922501
In multiple clusters			IMAGE	635521
In multiple clusters			IMAGE	1923181
In multiple clusters			IMAGE	961947
In multiple clusters			IMAGE	476765
In multiple clusters			IMAGE	1924894
In multiple clusters			IMAGE	1432468
In multiple clusters			IMAGE	1970353
Sox6	Mm.4656	SRY-box containing gene 6"	IMAGE	1068053
Cd44	Mm.24138	CD44 antigen"	IMAGE	1097108
Apoa1	Mm.26743	apolipoprotein A-I"	IMAGE	1891166
Hspa4	Mm.1032	heat shock protein 4"	IMAGE	537319
Cyp2j5	Mm.12838	cytochrome P450, 2j5"	IMAGE	1972701
Fac12	Mm.28962	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2"	IMAGE	3495850
Fac12	Mm.28962	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2"	IMAGE	4034989

Elavl3	Mm.3477	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)"	IMAGE	404503
Sall2	Mm.39487	sal-like 2 (Drosophila)"	IMAGE	372050
Ldb3	Mm.29733	LIM domain binding 3"	IMAGE	400512
Ccl9	Mm.2271	chemokine (C-C motif) ligand 9"	IMAGE	2648297
Ccl9	Mm.2271	chemokine (C-C motif) ligand 9"	IMAGE	313868
Kitl	Mm.4235	kit ligand"	IMAGE	1363758
Cap1	Mm.8687	adenylyl cyclase-associated CAP protein homolog 1 (S. cerevisiae, S. pombe)"	IMAGE	874778
Des	Mm.6712	desmin"	IMAGE	1260865
Des	Mm.6712	desmin"	IMAGE	1227515
Apoc2	Mm.28394	apolipoprotein C-II"	IMAGE	670784
Tcfec	Mm.36217	transcription factor EC"	IMAGE	1279309
Mep1a	Mm.5346	meprin 1 alpha"	IMAGE	848666
Klf3	Mm.28787	Kruppel-like factor 3 (basic)"	IMAGE	803312
Ccl25	Mm.7275	chemokine (C-C motif) ligand 25"	IMAGE	1106399
Ly64	Mm.3177	lymphocyte antigen 64"	IMAGE	1165454
Acadvl	Mm.18630	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain"	IMAGE	1499309
Acadl	Mm.2445	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain"	IMAGE	1400613
Fabp2	Mm.28398	fatty acid binding protein 2, intestinal"	IMAGE	482742
Pdcd8	Mm.30050	programmed cell death 8"	IMAGE	1499582
Pdcd2	Mm.323	programmed cell death 2"	IMAGE	352892
Cat	Mm.4215	catalase"	IMAGE	1481990
Gnat1	Mm.69061	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 1"	IMAGE	1886768
Gpld1	Mm.2779	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1"	IMAGE	1450433

Annexe 3 :

Liste des publications et communications

Publications

L. Ritié*, F. Alpy*, F. Jaubert, F. Becmeur, A. Méchine-Neuville, O. Lefebvre, C. Arnold, L. Sorokin, M. Kedinger and P. Simon-Assmann: **The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation.** Hum. Pathol., 2005, [36:1055-1065](#).
*premiers co-auteurs.

A. Stegmann, M. Hansen, Y. Wang, J.B. Larsen, L.R. Lund, L. Ritié, J.K. Nicholson, B. Quistorff, P. Simon-Assmann, J.T Troelsen and J. Olsen: **Gene regulatory networks along the small intestinal crypt-villus axis. Rewiring of a HNF-4 hub correlates with the appearance of villus lipids.** Am. J. Physiol, Physiological Genomics, 2006, 27:141-55

C. Rahuel, L. Ritié*, A. Filipe*, W. El Nemer, N. Patey-Mariaud, D. Eladari, J-P. Cartron, P. Simon-Assmann, C. Le Van Kim, and Y. Colin: **Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse.** Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 2008, F393-F406. *deuxièmes co-auteurs

L. Ritié, C. Spenlé, J Lacroute, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, A-L. Bolcato-Bellemin, M. Kedinger, G. Orend, P. Simon-Assmann: **Identification of laminin $\alpha 5$ gene signature in developing intestine.** Soumis à Molecular Biology of the Cell

Communications lors de congrès

First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies – Cologne, Allemagne 10-12 Mars 2005 - L.Ritié, A.-L. Bolcato-Bellemin, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, A. Klein, J.H. Miner, M. Kedinger, P. Simon-Assmann: **Laminin alpha 5 chain regulates transcription of epithelial- and muscle-specific genes in the mouse intestine** – Poster et communication orale sélectionnée

Gordon Research Conferences “Basement Membranes” – Barga, Italie 10-23 juin 2006 - L.Ritié, A.-L. Bolcato-Bellemin, O. Lefebvre, J. Lacroute, C. Bole-Feysot, B. Jost, A. Klein, J.H. Miner, M. Kedinger, P. Simon-Assmann: **Regulation of specific genes in the intestine is provided by the laminin $\alpha 5$ chain** – Poster et communication orale sélectionnée

Journées Francophones de Pathologies Digestives/CECED – Lyon, France 17-21 mars 2007 - L.Ritié, A.-L. Bolcato-Bellemin, J. Lacroute, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, A. Klein, M. Kedinger, P. Simon-Assmann: **Gènes cibles et voies de signalisation régulés par la chaîne alpha 5 de laminine dans l'intestin** – Communication orale et publication dans la revue Gastro-entérologie clinique et biologique

Mes travaux ont également été présentés par d'autres membres de l'équipe et collaborateurs:

Euroconference on Adhesion Receptors during development and pathologies – Obernai, France 17-22 octobre 2003 - A.-L. Bolcato-Bellemin, L.Ritié, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, A. Klein, J.H. Miner, L. Sorokin, M. Kedinger, P. Simon-Assmann: **Defects in intestinal laminin $\alpha 5$ chain lead to modifications of the integrin repertoire and of the Lutheran receptor** - Communication orale sur invitation

Biology post-genomic Era – Colmar, France 16-17 octobre 2003 - A.-L. Bolcato-Bellemin, L. Ritié, O. Lefebvre, C. Bole-Feysot, B. Jost, A. Klein, J.H. Miner, L. Sorokin, M. Kedinger, P. Simon-Assmann: **Intestinal transcriptome changes in intestinal laminin $\alpha 5$ chain mutants** – Poster

Inventing and Re-Inventing the GI tract – Stem cells, Development and Differentiation – Boston, USA 12-13 novembre 2004 - P. Simon-Assmann, L.Ritié, I. Jivkov, N. Turk, F. Alpy, J-F. Launay, O. Lefebvre, M. Kedinger: **Extracellular-matrix molecules signal intestinal morphogenesis and differentiation** – Conférence sur invitation

Fourth International Conference on Trefoil Factors – Illkirch, France 2-4 Decembre 2004 - O. Lefebvre, F. Alpy, N. Turck, I. Jivkov, L. Ritié, M. Vanier, P. Gendry, J-F. Launay, M. Kedinger and P. Simon-Assmann: **Basement membrane in intestine** – Conférence sur invitation

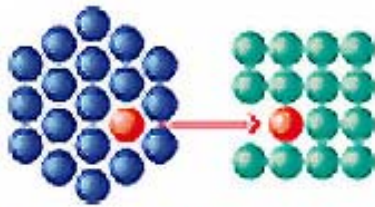
FASEB Conference. Gastrointestinal Tract XI: Innovations in GI Research and Therapy - Snowmass Village, Colorado USA 13-18 août 2005 - P. Simon-Assmann, L.Ritié, F. Alpy, I. Jivkov, N. Turk, J-F. Launay, O. Lefebvre, M. Kedinger: **Extracellular-matrix molecules signal intestinal morphogenesis and differentiation of the gut** – Conférence sur invitation

Gordon Research Conferences “Red Cells” - Aussois, France 20-25 mai 2007 – C. Rahuel, A. Filipe, L. Ritié, W. El Nemer, J-P. Cartron, P. Simon-Assmann, C. Le Van Kim, and Y. Colin: **Genetic inactivation of the laminin $\alpha 5$ chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse** – Poster

Adhérence et migration cellulaire : Récepteurs et molécules associées – Nice, France 2-3 avril 2008 – P. Simon-Assmann : **Fonctions des laminines** – Conférence sur invitation

Nouveau Chapitre de la Thèse :

Valorisation des compétences



Association Bernard Gregory

*Valorisation des compétences
« un nouveau chapitre de la thèse ® »*

Léa RITIÉ-PERTUSA

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Université Louis Pasteur de Strasbourg

Mentor : Mr. Bernard JUND

**Recherche du rôle des laminines, molécules
clés de l'environnement des cellules, dans
l'intestin normal et pathologique**

Sujet académique : Recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin normal et pathologique

Directeur de thèse : Dr. Patricia Simon-Assmann

Date probable de soutenance : mars 2008



Cadre général, présentation et enjeux de mon projet de recherche

Présentation succincte :

La façon dont les cellules interagissent entre elles et réagissent à leur environnement est déterminante pour notre santé. Lorsque ces interactions se dérèglent, des maladies dévastatrices, comme le cancer, peuvent en résulter. Je pense qu'un environnement adéquat des cellules est essentiel à leur bon fonctionnement.

Notre équipe de recherche s'intéresse aux laminines qui sont des composants essentiels de l'environnement cellulaire. Ces molécules sont très exprimées dans le système digestif et soupçonnées d'avoir un rôle essentiel dans le développement intestinal et dans le bon fonctionnement de l'intestin adulte en dépit des contraintes extérieures. Elles agissent en envoyant des signaux aux cellules pour influencer leur devenir. Elles font partie d'une structure tri-dimensionnelle appelée lame basale. Or le développement tumoral s'accompagne d'altérations de cette lame basale. Nous nous intéressons particulièrement au cancer du colon, organe dans lequel les laminines sont très présentes.

Mon projet de thèse consiste à décrypter les messages que les laminines sont capables d'envoyer aux cellules. Je cherche en effet à identifier les voies de signalisation (cheminement du message à l'intérieur de la cellule), les gènes cibles induits (en réponse à ce message) par les laminines et également à déterminer le rôle physiologiques de ces régulations. Cette étude des mécanismes fondamentaux m'a permis d'appréhender leur possible dérégulation dans l'intestin pathologique.

J'ai en effet découvert que la laminine 511, dans l'intestin, semblait pouvoir réguler 2 voies de signalisation qui sont connues pour être impliquées dans la tumorigénèse et la progression tumorale. Une dérégulation de la laminine 511 pourrait modifier l'induction de ces 2 voies de signalisation et engendrer la transformation de cellules intestinales en cellules tumorales.

Mon projet de recherche permettra d'une part d'élucider le rôle de la laminine 511 au cours du développement et dans le fonctionnement de l'organe mature. D'autre part, il permettra de déterminer son éventuelle implication dans les pathologies intestinales notamment dans les processus de tumorigénèse colo-rectale et d'élucider l'origine des perturbations des voies de signalisation cellulaires qui contribuent à l'apparition du cancer. Le but final serait d'élaborer des stratégies thérapeutiques qui permettront de supprimer ou d'optimiser ces mécanismes et donc de mieux lutter contre le cancer digestif. Les cancers colorectaux constituent en effet un problème majeur de Santé Publique. En 2000, le nombre annuel de nouveaux cas de cancer colorectal en France était estimé à 36000 nouveaux cas par an. D'après les estimations, il devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45000 nouveaux cas en 2020. Près de 16000 personnes décèdent chaque année de cette pathologie qui représente 15% des cancers. Le risque individuel de contracter un cancer colorectal est de 5% dans les pays industrialisés.

Ma thèse dans son contexte : (cf. organigramme p5)

Je travaille dans une Unité de Recherche biomédicale (Unité INSERM 682), composée de 5 équipes, qui s'intéresse au développement et à la physiopathologie de l'intestin et du pancréas.

L'équipe de recherche dans laquelle je réalise ma thèse est composée de deux chercheurs statutaires, d'un post-doctorant, de deux autres doctorants, d'une assistante ingénieur et d'une technicienne. Grâce à la situation stratégique de ce laboratoire au sein d'un grand complexe hospitalier (CHRU, Strasbourg), j'ai eu l'opportunité de travailler en collaboration avec les Services d'Anatomo-pathologie, de Pédiatrie, et de Biochimie et Biologie moléculaire.

Notre équipe de recherche entretient des contacts avec des réseaux de chercheurs spécialisés dans les mêmes domaines. Il s'agit, d'une part, de réseaux nationaux, à savoir la Société Française du Tissu Conjonctif dont je suis personnellement membre, la Société Française de Biologie du Développement, et le Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives. D'autre part, notre équipe de recherche fait partie de réseaux internationaux de chercheurs, notamment de spécialistes de la matrice extracellulaire (International Society of Matrix Biology). Des congrès regroupant les équipes membres de ces réseaux sont organisés annuellement et j'ai eu l'occasion d'y présenter oralement mes travaux de recherche.

Notre équipe de recherche participe également à des programmes nationaux de recherche en faisant notamment partie du Canceropôle Grand Est, et à un partenariat franco-allemand.

Par ailleurs, durant mon doctorat, ma directrice de thèse m'a confié plusieurs collaborations pour des projets de recherche nécessitant certaines compétences techniques ou théoriques que j'ai acquises au cours de ma thèse. Il s'agit d'une collaboration avec une équipe de recherche danoise et une autre avec une unité INSERM parisienne; ces deux collaborations ont amené à publication.

Ma thématique de recherche est en concurrence avec celle d'une équipe installée aux Etats-Unis qui travaille sur la même molécule et développe les mêmes modèles d'étude.

Moi dans le contexte de ma thèse :

Je suis actuellement Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche. Je termine ma thèse de Biologie Cellulaire et Moléculaire et j'enseigne en parallèle, depuis 4 ans, les TP/TD de Biochimie en Licence de Sciences de la Vie.

Après mon baccalauréat scientifique, je me suis tout d'abord inscrite en faculté de médecine. Mais plutôt que de m'intéresser au traitement de patients déjà atteints par la pathologie, j'ai préféré m'investir plus en amont, dans la compréhension de la pathologie et le développement de stratégie thérapeutique. C'est avec cette motivation que j'ai rejoint la Faculté des Sciences de la Vie. Suite à la Licence, j'ai choisi de réaliser un stage de recherche à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Illkirch-Graffenstaden), qui m'a conforté dans mon choix de parcours. Après une Maîtrise de Biochimie et un DEA de Biologie cellulaire et moléculaire, j'ai choisi de faire une thèse car je souhaitais obtenir un savoir théorique et technique solide que je puisse mettre au service de la lutte contre les pathologies humaines.

Je souhaitais consacrer mon travail de thèse à la recherche bio-médicale. Mon objectif était en effet

d'aborder expérimentalement les pathologies humaines en utilisant les outils modernes de la biologie. Je souhaitais trouver une thématique de recherche me permettant de travailler à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche diagnostique. Je suis donc heureuse d'avoir intégré l'Unité INSERM 682 qui s'intéresse à la physiopathologie du système digestif.

Déroulement et gestion du projet

Préparation et cadrage du projet :

La définition de mon projet est fondée sur des résultats obtenus antérieurement au laboratoire. Avant d'aborder la stratégie de mise en place du projet, j'ai tout d'abord réalisé une étude bibliographique afin d'acquérir les connaissances théoriques nécessaires à sa réalisation et de connaître les travaux déjà réalisés sur ce sujet par d'autres équipes éventuellement concurrentes.

Pour répondre à l'objectif du projet, nous avons décidé, en concertation avec ma directrice de thèse, d'utiliser une stratégie innovante (hybridation différentielle sur puce à ADNc) qui a nécessité la collaboration avec une plateforme spécialisée dans l'étude du transcriptome (caractérisation à grande échelle de l'expression des gènes). Nous avons réalisé une étude de faisabilité en comparant les différentes propositions techniques faites par la plateforme et en étudiant les possibilités financières. Après la décision de mise en route du projet, j'ai participé aux réunions de mise en place du projet avec les responsables de cette plateforme. Plutôt que de solliciter un service, j'ai demandé à être formée à ces techniques et à participer ensuite à leur application et à l'analyse informatique et statistique des résultats.

Face au risque d'échec du projet, j'ai mené des projets en parallèle de mon sujet de thèse principal, et, dès que possible, participé à des collaborations avec des équipes extérieures.

Conduite du projet :

- Mon projet de thèse s'est découpé en plusieurs phases :

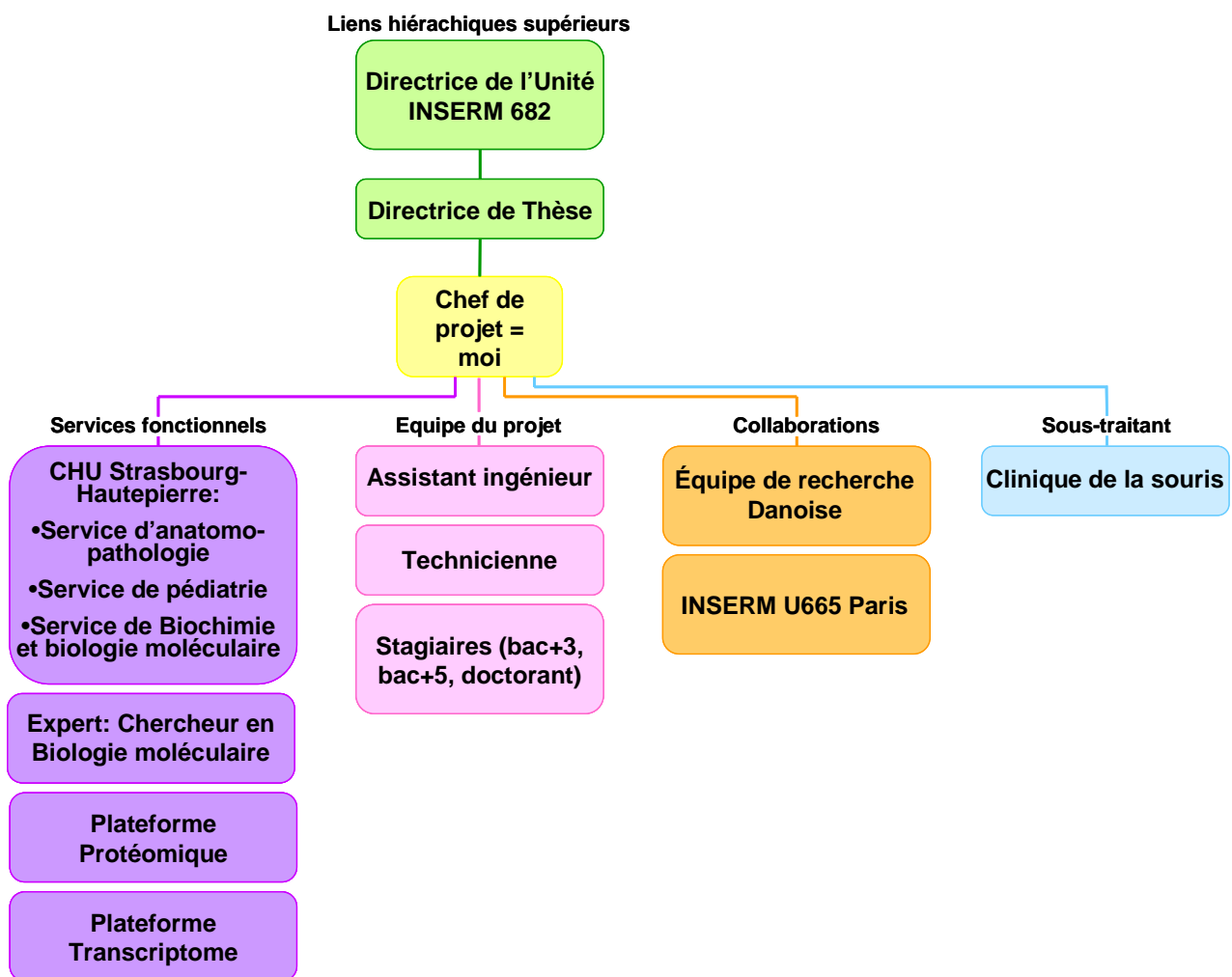
- L'objectif de mon travail étant d'identifier les gènes régulés par la laminine 511, j'ai tout d'abord réalisé une recherche à grande échelle des gènes impliqués parmi plus de 10000 gènes candidats. Cette première étape a nécessité 8 mois de travail.
- La deuxième phase a consisté en une grande étude bibliographique sur les 400 gènes qui sont ressortis de la première étape. Cette étude de 3 mois m'a permis de classer les gènes selon leur fonction ou leurs caractéristiques et de réaliser une seconde sélection plus ciblée.
- La recherche à grande échelle de gènes d'intérêt ayant été réalisée par une technique pouvant présenter de nombreux biais, la troisième phase de mon projet a été de confirmer par d'autres techniques, à plus petite échelle et individuellement la régulation de ces gènes par la laminine 511. Mon projet de recherche s'est avéré difficile dans le sens où j'étais confrontée à l'étude de molécules pour lesquelles le laboratoire n'avait jamais travaillé et ne possédait donc pas d'outils. Avant de répondre à mes objectifs de recherche, j'ai donc dû me

procurer ou fabriquer ces outils puis réaliser toute la mise au point technique que cela implique, ce qui a constitué un travail très long et qui s'avérait souvent décevant.

- Une fois les gènes cibles identifiés, la quatrième phase a été de rechercher les voies de signalisation induites par la laminine 511 qui mènent à ces régulations. Alors que j'avais précédemment utilisé des modèles de souris pour mener les trois premières phases de mon projet, cette quatrième phase a nécessité l'utilisation de modèles de culture cellulaire, plus appropriés pour l'étude des mécanismes moléculaires.
- La cinquième étape consiste à étudier ces mécanismes dans un contexte pathologique.
- La phase finale de mon projet de thèse correspond à la rédaction de publications présentant les résultats de mes travaux de recherche.

- Organisation des ressources humaines et des moyens techniques:

Organigramme du comité de pilotage de mon projet de thèse



Bien que je mène ma thèse de façon autonome, en concertation avec la responsable de l'équipe qui est également ma directrice de thèse, je travaille également en équipe dans le sens où je fais appel à

l'expertise de certains membres de mon équipe, notamment pour les questions de biologie moléculaire et d'histologie. J'interagis également étroitement avec la plateforme Protéomique, spécialisée dans la caractérisation du contenu protéique des cellules, qui se situe au sein de notre laboratoire et avec la plateforme Transcriptome de l'IGBMC (Illkirch-Graffenstaden). En tant que chef de ce projet de recherche, je bénéficie, de façon occasionnelle, de la contribution technique d'une technicienne et d'une assistante ingénieur. Quand cela m'est nécessaire, je leur demande leurs disponibilités, conviens avec eux d'une date et leur explique le déroulement de l'expérience. J'ai également recruté, à plusieurs reprises, des stagiaires que j'ai préalablement formés.

Par ailleurs, je suis en contact permanent avec nos collaborateurs et participe ainsi activement à l'entretien de nos relations : contacts téléphoniques, par e-mail, accueil suite à leurs déplacements, participation aux réunions.

Lorsque je rencontre un problème technique, je me charge de contacter les services techniques de nos fournisseurs industriels ou de nos partenaires scientifiques. Je me charge également de répondre à leur demande concernant un outil que nous leur avons fourni et que j'ai l'habitude d'utiliser.

- Gestion du temps et du planning de travail:

Chaque fin de semaine, je programme les expériences et les tâches plus administratives que je souhaite réaliser la semaine suivante. J'attribue souvent des critères de priorités aux différentes tâches à exécuter et le temps que j'estime nécessaire à leur réalisation. Ainsi quand débute une journée, j'essaie de réaliser les tâches selon leur ordre de priorité et de cadrer dans le temps prévu. Je me fixe des dates limites mais qui sont souvent repoussées du fait des difficultés techniques propres à la recherche scientifique. En effet, le fait de travailler sur du matériel provenant du vivant pose des limites techniques. Par exemple, lorsque que je dois travailler sur des intestins d'embryons de souris mutées, il se peut que les femelles ne soient finalement pas gestantes, que le nombre d'embryons soit insuffisant ou que les prélèvements n'aient pas les caractéristiques requises. Pour les pièces opératoires humaines, il arrive fréquemment que les prélèvements aient été mal conditionnés et ne soient au final plus exploitables. De façon imprévisible, les expériences doivent donc souvent être reconduites.

- Moyens de mesure d'efficacité, contrôle qualité et planification de nouveaux objectifs:

Régulièrement, je fais seule le point d'état d'avancement de mes projets, puis, tous les 2 mois environ, avec ma directrice de thèse et, en accord, nous décidons de l'orientation future du projet. Des réunions bimensuelles sont organisées au sein de notre équipe afin de discuter ensemble de l'analyse des résultats récemment obtenus. J'y présente mes résultats et leur analyse, explique les stratégies utilisées et les futurs travaux que j'envisage. Je recueille alors les avis et conseils de chaque membre de notre équipe.

Deux fois par an, je réalise un compte rendu de l'avancée de mon projet que je présente oralement à toute l'unité de recherche composée de 5 équipes indépendantes.

Après avoir ainsi validé qualitativement les résultats obtenus, je me pose de nouveaux objectifs à court, moyen ou long terme. Je regarde alors les outils nécessaires à la réalisation de ces objectifs et

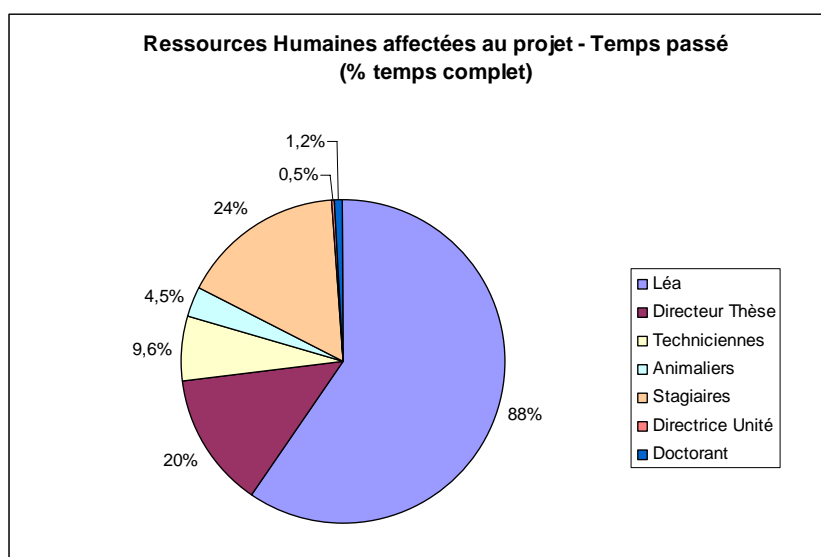
si je les ai à disposition ou si je dois me les procurer. Si tel est le cas, je réalise un comparatif de ceux qui sont commercialisés. Je recherche en parallèle ceux qui ont déjà été utilisés pour des travaux déjà publiés. Si un outil, n'est pas commercialisé mais qu'il s'agit d'une fabrication maison, en concertation avec ma directrice de thèse, je contacte l'équipe qui le possède afin de négocier son utilisation.

- Gestion financière :

Afin de pouvoir terminer mon projet de recherche et financer ma quatrième année de thèse, j'ai dû rechercher un financement. J'ai pour cela constitué des dossiers de candidature pour l'obtention de financement auprès de 3 associations (ARC, Ligue contre le Cancer et Fondation pour la Recherche Médicale) et également pour l'obtention d'un poste universitaire. J'ai rédigé moi-même le descriptif et l'argumentaire du projet de recherche.

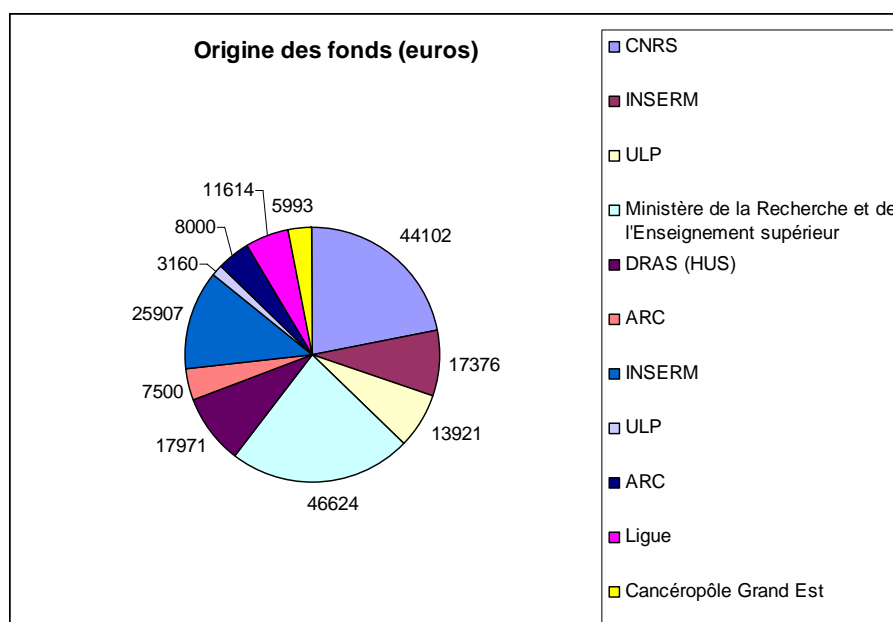
Evaluation et prise en charge du coût du projet : sur 4 années

- Ressources humaines affectées au projet :



- Dépenses associées au projet :

Nature	Coût (euros)
Charge salariale globale	220345
Dépenses matérielles	
- consommables	29609
- infrastructure	1860.46
- frais de déplacement	2242,31
TOTAL	254056,77



Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Expertise scientifique et technique :

Effectuer mon doctorat au sein de ce laboratoire m'a permis de développer une solide connaissance théorique dans le micro-environnement cellulaire, la signalisation cellulaire, la physiopathologie intestinale et la tumorigenèse.

Au cours de mon doctorat, j'ai appris à maîtriser des techniques très variées, en biologie moléculaire, notamment l'hybridation différentielle sur puce à ADNc, la RT-PCR quantitative et l'hybridation *in situ*, en biochimie (immunoprécipitation, Western Blot, analyse protéomique), en immunohistologie. J'ai également acquis un savoir faire technique dans l'utilisation de différents modèles pour tester mes hypothèses *in vitro* et *in vivo* : cultures cellulaires (lignées, primaires, transfection), culture bactérienne (transformation), souris transgéniques (gestion de lignée, dissection de souris adultes et embryonnaires).

J'ai par ailleurs développé des compétences en informatique : Word, Excel, PowerPoint, Adobe Photoshop, Internet, Blast, alignement de séquences, analyse d'image, quantification de signaux.

Durant ma thèse, j'ai souhaité compléter ma formation doctorale par un Diplôme Inter-Universitaire d'Investigateur en Essai Clinique des Médicaments (DIU-FIEC). J'ai ainsi été formée à la méthodologie des essais cliniques des médicaments permettant la conception, la réalisation, le suivi et l'analyse des essais thérapeutiques. J'ai acquis les bases méthodologiques en pharmacologie clinique et pharmacocinétique, celles relatives aux problèmes éthiques et réglementaires des essais et à la pharmacovigilance ainsi que les bases en statistiques nécessaires à la mise en place et à l'analyse des résultats des essais.

Compétences en communication :

J'ai acquis une bonne base en terme de communication.

Je réalise très régulièrement une présentation de l'avancée de mes travaux, fais part et défends mes idées concernant la suite du projet en réunion d'équipe ou de laboratoire. Je présente également régulièrement mes travaux de recherche lors de congrès nationaux et internationaux sous forme de communication écrite (conception de poster) ou en conférence orale, aussi bien en français qu'en anglais.

Les études bibliographiques en anglais que j'ai réalisées couramment au cours de ma thèse m'ont permis d'acquérir également une bonne maîtrise de l'anglais écrit.

J'ai par ailleurs rédigé des dossiers de demande de financement et des publications scientifiques qui ont développé mes capacités rédactionnelles et mon aptitude à l'argumentation pour la mise en valeur de mon projet.

Afin de développer mon sens de la communication, du contact et de la pédagogie, j'ai également enseigné pendant quatre années la Biochimie à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (Monitorat et ATER). Cette expérience m'a appris le métier de formateur et la didactique, et a facilité mon développement personnel en matière de pédagogie et de prise de parole en public. Transmission de savoir, préparation des cours, des sujets d'examen, correction de copies, gestion des étudiants, participation à la vie de son université sont autant de missions que j'ai réalisées à côté de ma thèse.

Construction d'un réseau personnel :

Afin de m'ouvrir au secteur privé, j'ai été responsable de l'organisation des forums BIOTechno 2004 et 2005 « Est » au sein de l'Association des Doctorants et Docteur d'Alsace. Le forum BIOTechno consiste en une journée de rencontre entre les jeunes chercheurs et les entreprises. Cet évènement s'inscrit dans un ensemble de manifestations nationales : les journées BIOTechno. L'organisation de ces journées est fédérée par le Réseau BIOTechno qui regroupe 17 associations de jeunes chercheurs des différentes villes universitaires de France. Nous avons donc interagi ensemble afin de mettre en commun nos idées et d'uniformiser ces journées pour leur donner un caractère national.

L'organisation de cet évènement m'a demandé un grand investissement. J'ai constitué une équipe de 6 personnes. La première étape a été de concevoir le programme du forum et de rechercher les intervenants. Il a ensuite fallu développer une stratégie de recherche de financement. Nous avons d'une part fait des demandes de subvention auprès d'une quarantaine d'institutions publiques. D'autre part, nous avons recherché des partenaires privés. Nous avons pour cela mis en place une démarche commerciale auprès d'une soixantaine d'entreprises et développé des supports de marketing. Nous nous sommes ensuite occupés de la logistique: réservation des salles, matériels, traiteur et achat des fournitures.

Nous avons lancé une campagne de publicité avec tout d'abord la conception d'un dossier de presse, suivi de l'organisation d'une conférence de presse à laquelle nous avons convié nos partenaires institutionnels et privés ainsi que 12 medias.

Nous avons également conçu et diffusé des flyers, des affiches, un spot publicitaire radio, un site

internet et des annonces par e-mail.

Tout au long de ce projet, il m'a fallu organiser et animer des réunions d'équipe, définir et répartir les tâches, gérer l'avancée et les résultats de mes équipiers, le budget et l'inscription des participants. Le jour J, il m'a fallu mettre en place l'organisation, définir les rôles de chacun, animer la journée auprès des participants et intervenants.

Cette expérience de confrontation au monde de la recherche privée m'a beaucoup appris sur le fonctionnement et la culture de l'entreprise dans le domaine des biotechnologies et m'a fait connaître de nombreux acteurs de ce secteur.

Compétences méthodologiques en gestion de projet :

Cette expérience professionnelle qu'est la thèse m'a appris à mener un projet, à gérer son avancement, à le défendre et à le mettre en valeur.

J'ai également acquis une bonne expérience dans la formation et l'encadrement de personnels. Les stagiaires que j'ai recrutés n'étaient pas expérimentés. J'ai dû leur définir un projet de recherche, ce qui constitue une capacité de prise de décision, leur expliquer les bases théoriques et ensuite son intérêt. J'ai dû les former techniquement, surveiller la bonne conduite de leurs expériences, leur expliquer comment analyser les résultats, vérifier leurs analyses. Il m'a fallu gérer leur planning et prévoir leurs futures expérimentations.

Mener le projet d'organisation du forum Biotechno m'a permis de renforcer mon expérience dans la gestion de projet, car j'ai dirigé et coordonné ce projet pour le mener à bien. J'ai également fortifié mon habilité à encadrer une équipe de travail et développé de nouvelles compétences pluridisciplinaires, en matière d'organisation d'évènement, de démarches commerciales, de marketing, de communication et de management.

De plus, forte d'une expérience dans l'aide à la création et la gestion d'une PME (Pro-secours EURL - Encadrement de manifestations, Aide Médicale Urgente, Formation), j'ai appris à connaître le fonctionnement administratif et juridique des entreprises, à définir des stratégies de développement, à identifier besoins et enjeux et à acquérir une ouverture d'esprit indispensable à la vie de l'entreprise.

Qualités personnelles :

Afin de mieux concilier et maîtriser la gestion de mes différents projets, j'ai fait preuve d'une grande adaptabilité et j'ai appris à organiser efficacement mon temps de travail. J'ai pour cela réalisé une formation de gestion du temps. J'ai ainsi appris à gérer des tâches très diverses en parallèle, ce qui a nécessité efficacité, rigueur et un grand sens organisationnel.

De nature persévérante et faisant preuve d'un optimisme à toute épreuve, je possède une réelle capacité à faire face et à résoudre les difficultés.

Mon sens du contact et de la diplomatie, et mon aptitude à la conciliation, m'ont donné une facilité à communiquer avec mes collaborateurs. J'ai ainsi acquis une capacité à travailler aussi bien de façon autonome qu'en équipe.

Je possède également une bonne capacité d'analyse et une ouverture à la critique qui m'ont permis

de mener mes projets à bien.

Résultats, impact de la thèse

Impact :

Mon travail de thèse a contribué à la notoriété du laboratoire notamment en terme de publications scientifiques. En effet, mes différents projets et collaborations ont amené à 5 publications dans des revues scientifiques. Mon travail a également été présenté au public scientifique lors de 5 congrès internationaux et 1 congrès national.

Mon travail de thèse a permis de mieux comprendre le rôle des laminines et plus généralement de l'environnement cellulaire dans le développement intestinal et dans le bon fonctionnement de l'intestin mature. Il a également contribué à élucider les dérégulations des laminines, et des voies de signalisation qu'elles induisent, potentiellement impliquées dans les cancers coliques.

De plus, un de mes travaux de recherche a consisté à étudier le rôle des laminines dans la maladie de Hirschprung. La maladie de Hirschprung est un défaut de mobilité du tube digestif se traduisant par un mégacôlon, dû à une absence d'un type de cellules nerveuses dans les plexus nerveux intestinaux. Elle se déclare chez les jeunes enfants. J'ai montré une délocalisation de l'expression de certaines laminines au sein des plexus. Cette modification pourra être utilisée par les services d'anatomo-pathologie comme marqueur diagnostique de la maladie.

Pistes professionnelles :

L'expérience professionnelle que j'ai acquise au cours de mes années de thèse me conforte dans l'objectif de poursuivre ma carrière de chercheur ou d'enseignant-chercheur à l'interface entre la recherche biomédicale et la recherche fondamentale en biologie. Après la thèse, deux perspectives professionnelles sont à envisager :

➤ D'une part, dans le secteur de la recherche privée, où je souhaiterais obtenir un poste de chef de projet dans la recherche diagnostique, thérapeutique ou clinique. Mes différentes expériences professionnelles m'ont permis de développer des compétences pluridisciplinaires, une capacité de travail autonome, en équipe et dans le cadre de collaboration et une ouverture d'esprit que je souhaiterais vivement mettre au service des entreprises. J'ai déjà commencé à me constituer un réseau de connaissances.

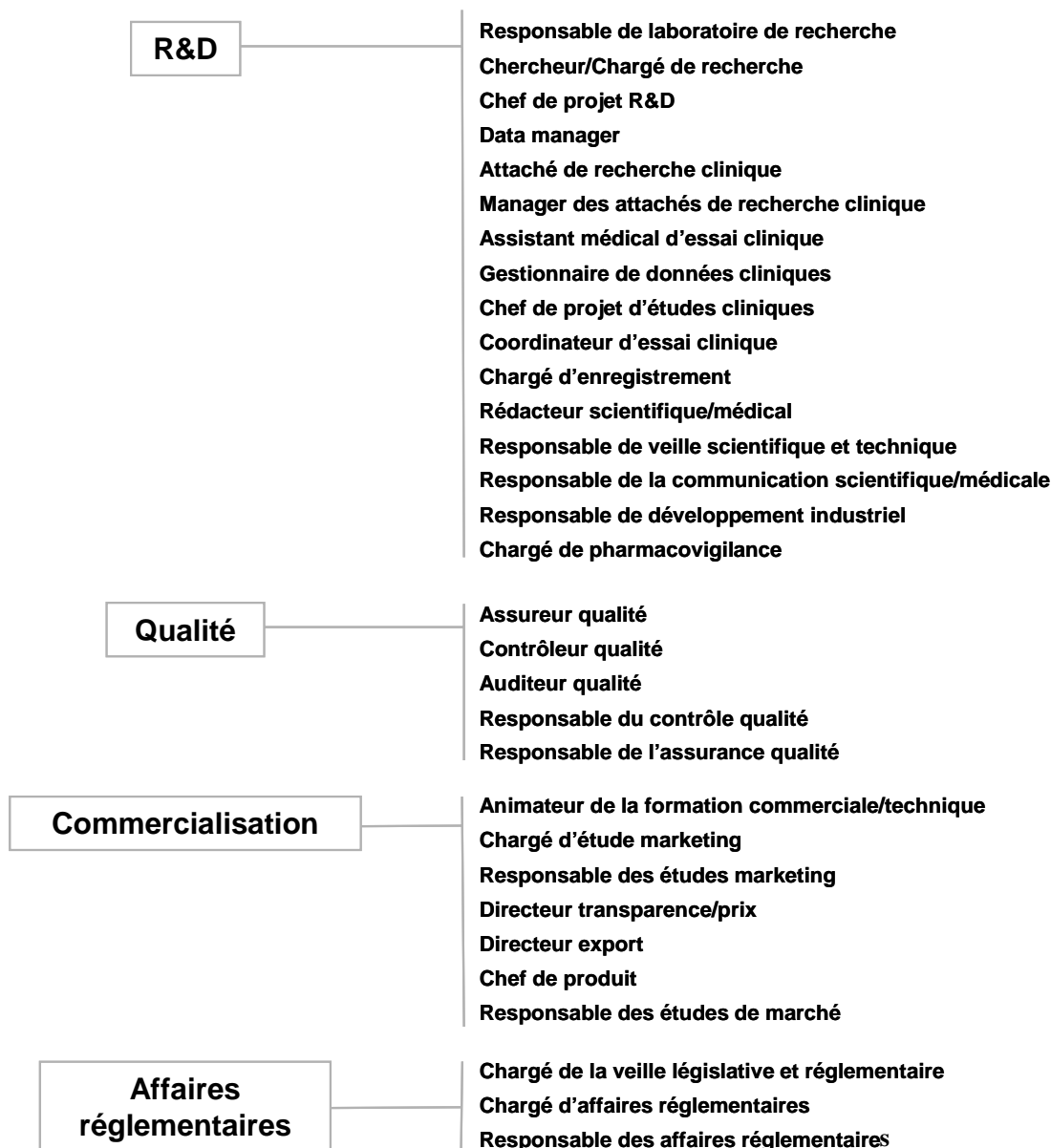
Je pense cibler trois types d'entreprises lors de ma future recherche d'emploi : l'industrie pharmaceutique, les « Contract Research Organization », et les « Start-up » du secteur des biotechnologies. J'ai identifié ci-dessous les différents postes qui me seraient accessibles à court ou moyen terme compte tenu de mes formations et compétences. Parmi ces postes, mes préférences vont a priori à l'obtention d'un poste dans un département Recherche et Développement en tant que chargé de recherche ou chef de projet dans la recherche diagnostique ou thérapeutique, ou en tant que chef de projet, coordinateur ou gestionnaire de données d'études cliniques.

Secteurs



Départements

Postes



➤ D'autre part, riche de quatre années d'expérience dans l'enseignement supérieur, ayant un grand sens du contact, et au vu des spécialités de mon cursus et des disciplines scientifiques associées à mon projet de recherche doctoral, je pourrais après un stage post-doctoral, faire acte de candidature aux concours de maître de conférence dans les sections Biochimie et Biologie Moléculaire (CNU 64) et Biologie Cellulaire (CNU65).

Résumé

La chaîne $\alpha 5$ de laminine, représentante majeure des lames basales, est médiatrice des interactions épithélio-mésenchymateuses indispensables à la morphogenèse et à l'homéostasie de l'intestin. Ce travail de thèse a révélé que les souris mutantes pour le gène *Lama5* présentent une altération d'expression de gènes de différenciation épithéliale et musculaire, de molécules d'adhésion et de 2 voies de signalisation, la voie de la PI3Kinase/Akt et la voie Wnt. Cette étude a permis de démontrer que la chaîne $\alpha 5$ est une molécule signal capable de réguler l'expression de gènes cibles lui conférant un rôle dans plusieurs fonctions biologiques dans les cellules intestinales - prolifération, survie, migration et différenciation. La chaîne $\alpha 5$ favorise notamment la survie cellulaire en induisant l'activation d'Akt via la PI3K. L'invalidation génique d'un des récepteurs de la chaîne $\alpha 5$, le Luthéran, a révélé l'importance de la signalisation laminine $\alpha 5$ /Luthéran pour l'intégrité tissulaire du rein et du muscle intestinal. Cette signalisation est essentielle à une organisation normale des lames basales dans ces deux tissus. Enfin, j'ai montré que la chaîne $\alpha 5$ de laminines est dérégulée dans deux pathologies intestinales : la maladie de Hirschsprung et le cancer colorectal. Les intestins atteints de maladie de Hirschsprung présentent une accumulation de chaîne $\alpha 5$ dans le muscle qui pourrait partiellement être à l'origine de l'aganglionose intestinale caractéristique de cette maladie. Par cette étude, nous avons mis en évidence une nouvelle caractéristique des cas d'aganglionose qui est la présence anormale de cellules de Schwann au sein des plexus entériques et révélé une modification du profil d'expression de plusieurs laminines qui pourra être utilisé comme marqueur diagnostique des cas d'aganglionose. Ce travail a par ailleurs montré une dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ dans les cancers colorectaux. La chaîne $\alpha 5$ est en effet trouvée sur-exprimée dans les zones tumorales encore bien différenciées où elle pourrait contribuer aux phases précoces de la tumorigenèse. En revanche, son expression chute dans les zones plus altérées permettant certainement l'invasion tumorale. En conclusion, ce travail de thèse a montré que la chaîne $\alpha 5$ de laminine est une molécule signal du microenvironnement cellulaire qui influence le devenir des cellules intestinales en régulant de nombreux processus cellulaires essentiels au développement et à l'homéostasie intestinale.

Summary

The laminin $\alpha 5$ chain, a major component of the basement membrane, plays an essential role in intestinal morphogenesis and homeostasis by driving epithelial-mesenchymal interactions. The present work demonstrated, in intestines lacking the laminin $\alpha 5$ chain, an alteration of genes implied in epithelial and muscle differentiation, of some adhesion receptors and a deregulation of Wnt and PI3K/Akt signaling pathways. We identified the laminin $\alpha 5$ chain as a signaling molecule able to induce expression of specific genes that will trigger various cellular processes including proliferation, survival, migration and differentiation of intestinal cells. The $\alpha 5$ chain has notably an anti-apoptotic effect by inducing the PI3K-dependent activation of Akt. We also studied the role of Lutheran, an exclusive receptor for the $\alpha 5$ chain by gene invalidation in mice. We showed that the laminin $\alpha 5$ chain/Lutheran signaling is essential for renal and intestinal muscle integrity and is required for a normal organization of basement membranes. Finally, I have shown the deregulation of laminin $\alpha 5$ chain in two intestinal diseases: Hirschsprung disease and colorectal cancer. First, we found an accumulation of $\alpha 5$ chain in intestinal muscle of patients with Hirschsprung disease which could be implied in the pathogenesis. We identified the abnormal presence of Schwann cells and found modifications in the expression profile of several laminin chains in aganglionic plexuses that could be new markers of intestinal aganglionosis. Second, we highlighted the deregulation of laminin $\alpha 5$ chain in colorectal tumors. Indeed, $\alpha 5$ chain is overexpressed in still differentiated tumor areas where it could participate in onset of tumorigenesis. With increasing grade of the tumors, the $\alpha 5$ chain expression becomes downregulated to permit tumoral cell invasion. In conclusion, this work identified the laminin $\alpha 5$ chain as a signal molecule of the cell microenvironment which determines intestinal cell fate during intestinal development and homeostasis.