

UMR_S 682
De l'Homéostasie Tissulaire au
Cancer et à l'Inflammation

Michèle Kedinger
Directeur

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

Inserm



Institut national
de la santé et de la recherche médicale



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

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par **Caroline Spenlé**

La laminine-511, acteur de l'inflammation et de la progression tumorale dans l'intestin?

Soutenue publiquement le 13 décembre 2010

Membres du Jury

Directeur de thèse : Dr. Patricia Simon-Assmann, INSERM U682 Strasbourg

Rapporteur externe : Dr. Muriel Jacquier-Sarlin, Université Joseph-Fourier Grenoble

Rapporteur externe : Dr. Sophie Thenet, UMR S 872 CRC Paris

Examineur interne : Pr. Jean-Luc Imler, Université de Strasbourg

Membre invité : Pr. Marie-Pierre Chenard, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury, M^{me} Sophie Thenet, M^{me} Muriel Jacquier-Sarlin, M. Jean-Luc Imler et M^{me} Marie-Pierre Chenard de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie sincèrement M^{me} Michèle Kedinger, directrice de l'unité Inserm-UdS 682, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et de m'avoir prodigué conseils et encouragements tout au long de ma thèse.

Je remercie très chaleureusement M^{me} Patricia Simon-Assmann d'avoir encadré ce travail, de m'avoir soutenue, supportée, encouragée et d'avoir toujours été disponible et à l'écoute ! Mille Mercis !!!! Ces 4 années furent une expérience très heureuse et enrichissante en très très grande partie grâce à toi !

To Mrs. Gertraud Orend, Thank you so much for your very stimulating influence and your good advices, it is very nice to work with you. Think positive!

Merci beaucoup à M. Olivier Lefebvre de m'avoir enseigné la biologie moléculaire et d'avoir toujours su trouver un petit moment pour répondre à mes nombreuses questions.

Je tiens à remercier M^{me} Agnès Neuville et M^{me} Florence Guenard pour leur aide précieuse concernant les prélèvements humains.

Mes bonnes fées marraines Annick et Christiane, Merci infiniment ! Je n'aurais jamais réussi à boucler sans vous, et merci pour la super ambiance qui règne en histo, à la paillasse, en culture, à l'animalerie... Merci pour le soutien et les p'tits conseils ! Une pensée pour Cristina, le temps que tu as passé parmi nous était très agréable.

Merci à toute la GO team, c'est grâce à vous que nous avons une si bonne ambiance de travail ! Dominique (Bagnard), Guy et Gérard, merci pour les remarques pertinentes et les avis critiques.

Elmina, Anja, Inès, Laurent et surtout Isabelle et Falk, je vous souhaite le meilleur pour votre thèse ! Michaël, merci pour les dépannages en Bl.6 et pour les gâteaux de la semaine d'Halloween. Ces années passées avec vous ont été un régal.

Merci à Anne-Laure de m'avoir initié à l'art de la transfection ! Et merci également pour les conseils avisés sur les choix de carrière.

Merci à Joël d'avoir initié le projet Crohn, et merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur !

Merci à M. Frédérick Barreau pour son accueil et pour m'avoir initiée aux Elisa.

Une pensée pour mes stagiaires, tout particulièrement pour Corinne ! Merci pour la bonne humeur et l'intérêt que vous avez porté au projet. Croyez moi, l'expérience a été très formatrice pour moi également!

Je remercie toute l'unité 682, les chefs Jean-Noël, Gérard (Gradwohl, ex-U682), Manuela, et surtout Dominique (Guenot) pour leurs bons conseils. Merci à Erwan pour les coups de main p53 ! Merci beaucoup à Elisabeth pour les cellules (si, cette fois ce sont les dernières... quoi que ?) et ta bonne humeur. Merci à Isabelle (Gross) pour son enthousiasme communicatif. Merci à Isabelle (Duluc), Marie, Nadine et Claire. Thoueiba, Isabelle (Hinkel), Lyliia, Katia et Manon, le meilleur pour votre thèse !

Isabelle (Gillot) et Léonor, Merci de tout cœur pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Merci à Patrick, Christophe et Jean-François pour vos précieux conseils protéomiques, et merci Patrick pour toutes les petites réparations !!

Merci à Pascal et aux animaliers Michèle, Fanny, Pierre et Claude pour votre bonne humeur, et merci à Fanny pour ses mails « remonte-moral »

Une pensée pour les anciens, Léa, Anthony, Ivo, Alexandre, Fairouz et Céline...ainsi que pour les nouveaux arrivants !

Enfin, je tiens à remercier très chaleureusement ma famille, en particulier mes parents, et Alexandre pour leur soutien inconditionnel !

**Ce travail a été financé par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur
et par la Ligue Nationale Contre le Cancer**

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS -----	9
OBJECTIFS DU PROJET DE DOCTORAT -----	11
INTRODUCTION -----	15
I. L'INTESTIN -----	17
I.1 Anatomie et histologie de l'intestin -----	17
I.1.1. Muqueuse intestinale -----	18
I.1.2. La sous-muqueuse-----	19
I.1.3. La musculuse -----	19
I.2. Principales populations cellulaires de l'épithélium intestinal -----	19
I.2.1. Les cellules souches -----	20
I.2.2. Les entérocytes -----	20
I.2.3. Les cellules caliciformes ou cellules à mucus-----	20
I.2.4. Les cellules entéroendocrines -----	21
I.2.5. Les cellules de Paneth -----	21
I.2.6. Les cellules M -----	21
I.3. Développement intestinal -----	21
I.3.1. Développement selon l'axe cranio-caudal -----	21
I.3.1.1. Développement de l'intestin antérieur -----	21
I.3.1.2. Développement de l'intestin moyen-----	22
I.3.1.3. Développement de l'intestin postérieur-----	22
I.3.2. Développement selon l'axe crypto-villositaire-----	22
I.3.2.1. Différenciation de l'endoderme en épithélium intestinal -----	23
I.3.2.2. Différenciation du mésenchyme -----	24
I.3.3. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement et l'homéostasie de l'intestin ----	24
I.3.4. Les interactions épithélio-mésenchymateuses lors du développement-----	26
I.4. Fonction digestive de l'intestin -----	27
I.4.1. Digestion enzymatique et absorption des nutriments -----	27
I.4.2. Elimination des résidus et réabsorption de l'eau-----	28
I.4.3. Contrôle endocrinien de la digestion -----	28
I.4.4. La flore digestive -----	28
I.5. La barrière intestinale muqueuse -----	29
I.5.1. Généralités -----	29
I.5.2. Microbiome et altération de la barrière muqueuse-----	29
I.5.3. Rôle du mucus et des mucines-----	30
II. LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN -----	31
II.1. Introduction -----	31
II.2. Caractères distinctifs de la maladie de Crohn (MC) et de la Rectocolite hémorragique (RCH) -----	32
II.3. Physiopathologie -----	33
II.3.1. Réponse immunitaire -----	33
II.3.1.1. Dérégulation de la réponse immunitaire innée-----	33
II.3.1.2. Dérégulation de la réponse immunitaire adaptative -----	33
II.3.2. Predisposition génétique -----	33
II.3.3. Facteurs environnementaux-----	34
II.4. Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation intestinale -----	34
II.4.1. Voie TGF- β /Smad -----	34
II.4.2. Voie NF-kappaB -----	35
II.4.3. La voie JAK/STAT, les interleukines et le TNF α : des cytokines impliquées dans l'inflammation-----	36
II.5. Cancers associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin -----	36
II.5. Modèles animaux d'étude des colites -----	37
II.5.1. Modèles spontanés -----	37
II.5.2. Modèles induits chimiquement-----	38
II.5.2.1. Induction par un haptène-----	38
II.5.2.2. Induction par le DSS -----	38
II.5.3. Modèles génétiques -----	38

II.5.3.1. Modèles de knock-out	38
II.5.3.2. Modèles transgéniques de surexpression	38
II.5.4. Modèles de cancer associé aux colites	39
III. ÉLÉMENTS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	39
III.1. La lame basale, spécialisation de la matrice extracellulaire	39
III.2. Les principaux composants de la lame basale	39
III.3. Les laminines	40
III.3.1. Structure	40
III.3.2. Origine cellulaire des laminines et des molécules de la lame basale dans l'intestin	41
III.3.3 Implication des laminines en pathologie	42
III.3.4. Généralités sur les laminines présentes au niveau de l'intestin	43
III.3.4.1. La chaîne $\alpha 2$ de laminine	44
III.3.4.2. La chaîne $\alpha 3$ de laminine	44
III.3.4.3. La chaîne $\alpha 4$ de laminine	44
III.4. La laminine-511	44
III.4.1. Le gène <i>lama5</i>	44
III.4.2. Expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine	45
III.4.3. Rôles de la chaîne $\alpha 5$ de laminine	45
III.4.3.1. Étude des souris invalidées pour le gène <i>lama5</i>	45
• Exencéphalie	45
• Dymorphogénèse placentaire	46
• Défauts de la glomérulogénèse rénale	46
• Défauts du développement pulmonaire	46
• Défauts de migration des cellules de la crête neurale	47
• Autres défauts de morphogénèse des souris <i>lama5^{-/-}</i>	47
III.4.3.2. Rôle au niveau intestinal	47
III.5. La laminine-111	49
III.5.1. Le gène <i>lama1</i>	49
III.5.2. Expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine	50
III.5.3. Rôle de la chaîne $\alpha 1$ de laminine	50
III.5.3.1. Dans le développement embryonnaire	50
III.5.3.2. Dans la différenciation intestinale	50
III.5.3.3. Dans la différenciation rétinienne	51
III.6. Récepteurs de la chaîne $\alpha 5$ de laminine	51
III.6.1. Les intégrines	51
III.6.2. Le dystroglycan et le Luthéran	53
III.7. Les Ténascines	53
III.7.1. Structure	53
III.7.2. Expression	54
III.7.3. Rôle biologique	54
III.7.4. Implication dans les pathologies	55
III.8. Lien entre les molécules de la matrice extracellulaire, les MICI et le cancer colorectal	55
III.8.1. Implication des molécules de laminines et de la TNC dans les MICI	55
III.8.2. Implication des laminines et des ténascines dans le cancer colorectal	56
III.8.2.1. Rôle des laminines, et plus particulièrement des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ dans le cancer colorectal	56
III.8.2.2. Implication des TNC et TNW dans le cancer colorectal	57
RESULTATS	59
PARTIE 1 : ÉTUDE DU RÔLE DE LA CHAÎNE $\alpha 5$ DE LAMININE DANS L'INTESTIN AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DANS L'ORGANE MATURE	61
I. RECHERCHE DES GÈNES CIBLES ET DES VOIES DE SIGNALISATION RÉGULÉES PAR LA CHAÎNE $\alpha 5$ DE LAMININE AFIN DE DÉTERMINER SON RÔLE BIOLOGIQUE DANS L'INTESTIN	63
II. RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE LA PUBLICATION 1	63
III. PUBLICATION 1: ABNORMAL WNT AND PI3KINASE SIGNALING IN THE MALFORMED INTESTINE OF <i>LAMA5</i> DEFICIENT MICE	65

IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES-----	97
IV.1. Recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin adulte-----	97
IV.1.1. Description du modèle-----	97
IV.1.1.1. Souris <i>lama5^{flox/flox}</i> -----	97
IV.1.1.2. Souris Villine-Cre-----	97
IV.1.2. Vérification de la délétion-----	98
IV.1.2.1. Recherche de l'allèle défloxe-----	98
IV.1.2.2. Expression transcriptionnelle du gène <i>lama5</i> -----	98
IV.1.2.3. Expression de la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur Villine-----	99
• Dans l'intestin adulte-----	99
• Lors du développement-----	100
IV.1.3. Perturbation de la lame basale dans les intestins mutants-----	101
IV.1.4. Morphologie et cytodifférenciation-----	101
IV.2. Mise au point de lignées intestinales adultes de souris immortalisées-----	102
IV.2.1. Caractérisation des lignées immortalisées obtenues-----	103
IV.2.2. Défloxe du gène <i>lama5</i> -----	103
V. DISCUSSION DES RESULTATS-----	107
V.1. La chaîne $\alpha 5$ régule 2 voies de signalisation aboutissant à des effets biologiques variables-----	107
V.2. La chaîne $\alpha 5$ régule la morphogenèse intestinale adulte-----	108
V.3. L'absence de chaîne $\alpha 5$ épithéliale entraîne vraisemblablement une compensation tissulaire-----	109
V.4. Établissement de lignées intestinales déficientes en chaîne $\alpha 5$ de laminine : une voie de sauvetage ? -----	111
PARTIE 2 : RECHERCHE DU ROLE DES LAMININES DANS LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN -----	113
I. BASE DU PROJET-----	115
II. RESUME DES RESULTATS DE LA PUBLICATION-----	115
III. PUBLICATION 2 : NUCLEAR P53 ACCUMULATION IS ASSOCIATED WITH LAMININ UPREGULATION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES-----	117
IV. NOTES RELATIVES A LA PUBLICATION 2-----	153
V. DISCUSSION DES RESULTATS-----	157
V.1. Chronologie des évènements en réponse à l'ulcération : accumulation nucléaire de la protéine <i>p53</i> et expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines-----	157
V.2. Rôle des laminines dans l'inflammation-----	158
V.3. Devenir des glandes UACL ? Vers la régénération cellulaire ou la tumorigenèse ?-----	158
V.3.1. Hypothèse du fonctionnement normal de la protéine p53 WT : régénération ?-----	159
V.3.2. Hypothèse d'une mutation de p53 : tumorigenèse ?-----	160
PARTIE 3, TRAVAIL DE COLLABORATION : ÉTUDE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS UN MODELE D'INSULINOMES MURIN SUREXPRIMANT LA TENASCINE-C -----	163
DISCUSSION GENERALE-----	173
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	179
ANNEXES -----	199

I. COMMUNICATIONS AUX CONGRÈS-----	201
II. REVUE 1 : THE ROLE OF THE BASEMENT MEMBRANE AS A MODULATOR OF INTESTINAL EPITHELIAL- MESENCHYMAL INTERACTIONS-----	203
III. REVUE 2 : ROLE OF LAMININS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS -----	237

Liste des abréviations

5-ASA : acide 5-aminosalicylique
Ad- CMV-Cre : Adénovirus-Cre-recombinase-CytomégaloVirus
APC : adenomatous polyposis coli
AOM : azoxyméthane
 α SM : α -actine de muscle lisse
Actg2 : Actin gamma-enteric smooth muscle 2
AgT : antigène T
Bcl2 : B-cell lymphoma 2
bHLH : basic helix-loop-helix
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine
CAC : cancer associé aux colites
CAR : Cocksackie B and adenovirus receptor
CARD15 : caspase recruitment domain family, member 15
CBC : columnar crypt based cells
CCK : Cholécystokinine
CCR : cancer colorectal
CD31: cluster of differentiation 31
Cdk4 : Cyclin-dependent-kinase 4
Cdx2 : caudal-related homeobox 2
DAPI : 4',6'diamidino-2-phénylindole
DSS : dextran sulfate de sodium
Dvl : Dishevelled
E : jour de vie embryonnaire
EGF-R : epidermal growth factor-receptor
FABP : Fatty Acid Binding Protein
FN : fibronectine
GAG : glycosaminoglycane
GFP : Green Fluorescent Protein
HNF : Hepatocyte Nuclear Factor
HOX : homeobox
IBD : Inflammatory bowel disease
IBMP : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
Ig : immunoglobuline
IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IHH : Indian HedgeHog
IKK : I kappa B Kinase
IL : interleukine
JAK : Janus Kinase ou Just Another Kinase
KLF : Krüppel like factor
LM : laminine
LRP : lipoprotein-related protein
MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MMP : Matrix Metalloproteinase
MOI : multiplicity of infection

MSX : Muscle Segment Homeobox
MyoD : Myogenic Differentiation Antigen
Neo : néomycine
NF- κ B : Nuclear Factor-KappaB
NOD2 : nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne
Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
PI3K : Phosphatidyl Inositol Kinase 3
PITX2 : Pituitary Homeobox 2
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
SFRP : Secreted Frizzled-Related Protein
SHH : Sonic HedgeHog
siRNA : small interference RNA (Ribonucleic acid)
Smad4 : homolog of mother against decapentaplegic, drosophila, 4
SOX : SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT : signal transducers and activators of transcription
SV40 : Simian Virus 40
TCF/LEF : T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TGF β : transforming growth factor β
TN : ténascine
TNF α : tumor necrosis factor α
TLR : toll-like receptor
UACL : ulcer-associated cell lineage
Wnt : Wingless related MMTV integration site family
wt : wild type

Objectifs du projet de doctorat

Mon travail de recherche doctoral vise à démontrer le rôle des laminines, et plus particulièrement de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, dans le développement et les pathologies intestinales. Les laminines, éléments de la matrice extracellulaire, sont à la fois des régulateurs de l'adhésion cellulaire et des médiateurs des voies de signalisation via des récepteurs spécifiques. Leur importance physiologique est démontrée par le fait que des mutations de certaines de ces laminines conduisent à des pathologies telles que des épidermolyses bulleuses ou des myopathies congénitales et que l'inactivation de la plupart des chaînes de laminine dans les modèles murins entraîne de graves défauts de développement aboutissant la plupart du temps à la létalité. L'épithélium intestinal est un modèle très intéressant de renouvellement cellulaire continu à partir de cellules souches multipotentes, et d'équilibre entre deux fonctions majeures : prolifération et différenciation. Ces deux phénomènes ont lieu respectivement dans les cryptes/glandes coliques et dans les villosités/épithélium de surface de l'intestin grêle et du côlon. Une rupture de l'homéostasie de l'ensemble de ces mécanismes est centrale dans la progression tumorale. L'homéostasie intestinale est dérégulée dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui, dans une certaine proportion, peuvent dégénérer en cancer colorectal.

Bases du projet et objectifs du travail de thèse

Après avoir effectué mon stage de Master (Biologie cellulaire intégrée, parcours développement) dans l'équipe du Dr. Gérard Gradwohl à l'unité INSERM U-682, j'ai rejoint l'équipe du Dr. Patricia Simon-Assmann pour ma formation doctorale. A mon arrivée dans cette équipe, un travail visant à identifier les voies de signalisation induites par la chaîne $\alpha 5$ de laminine ainsi que ses gènes cibles dans le but d'élucider les bases moléculaires du rôle de cette chaîne dans le développement et la fonctionnalité de l'intestin normal et pathologique avait été démarré par Léa Ritié-Pertusa. Mon travail de thèse, qui s'est inscrit dans un premier temps dans le prolongement direct de ce projet, sera présenté dans mon manuscrit en 3 parties:

Mon équipe d'accueil a pu établir que le phénotype intestinal des embryons invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine était parallèle à une modification de certains gènes de la voie Wnt. Pour ce faire, l'expression génique d'intestins embryonnaires invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ a été comparée à celle d'intestins contrôles. Parmi les gènes dérégulés révélés par l'analyse transcriptomique se trouvent de nombreux gènes reliés aux voies Wnt et PI3Kinase. Dans un premier temps, j'ai donc contribué à la vérification de la dérégulation de certains de ces gènes,

puis j'ai participé à la démonstration d'un lien existant entre la voie Wnt et la chaîne $\alpha 5$ de laminine (Manuscrit 1 en soumission).

Les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine présentent une létalité embryonnaire aux alentours du stade E17. Afin d'avoir la possibilité d'étudier la fonction de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans des étapes plus tardives de la morphogenèse intestinale et en particulier dans l'intestin adulte, j'ai utilisé une stratégie d'invalidation conditionnelle mettant en jeu des souris floxées pour le gène *lama5* et des souris exprimant la recombinaison Cre sous contrôle d'un promoteur spécifique de l'épithélium intestinal : le promoteur villine. La description du modèle et l'analyse phénotypique des intestins adultes invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ seront détaillés en résultats complémentaires. L'ensemble de ces données feront l'objet de la première partie de ce manuscrit :

Partie 1 : Étude du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin au cours du développement et dans l'organe mature

Concernant la possible implication de la chaîne $\alpha 5$ dans les pathologies intestinales, peu de travaux ont été publiés jusqu'à présent, et les données ne sont que parcellaires et descriptives. La question se pose de savoir s'il existe une possible intervention des chaînes de laminines dans la pathologie et la progression des MICI. Par ailleurs, une certaine proportion de ces maladies peut dégénérer en cancer colorectal, et il est intéressant de définir le rôle potentiel des laminines, et en particulier des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$, dans ce phénomène. Grâce à une collaboration avec les services de gastroentérologie et d'anatomopathologie de l'Hôpital Universitaire de Strasbourg-Hautepierre, j'ai disposé d'exérèses chirurgicales coliques de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Les données de ce travail sont résumées dans le manuscrit 2 qui sera soumis à publication et feront l'objet de ma deuxième partie incluant également des résultats complémentaires :

Partie 2 : Dérégulation des laminines dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Peu après le début de mon doctorat, notre équipe a fusionné avec celle du Dr. Gertraud Orend, qui s'intéresse au microenvironnement tumoral et plus particulièrement aux ténascines. J'ai pu participer à un travail de collaboration visant à caractériser la matrice extracellulaire dans un modèle murin d'insulinomes qui surexpriment la TNC. Les résultats que j'ai acquis dans ce travail seront présentés rapidement dans une troisième partie :

Partie 3 : Caractérisation du microenvironnement d'insulinomes murins surexprimant la TNC

Introduction

I. L'intestin

I.1 Anatomie et histologie de l'intestin

L'intestin est la partie la plus longue du tractus digestif. Il fait directement suite à l'estomac par la jonction duo-pylorique et comprend deux parties : l'intestin grêle, lui-même subdivisé en trois (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin composé du caecum (auquel est rattaché l'appendice), du côlon (divisé en 4 segments : le côlon ascendant ou droit, le côlon transverse ou horizontal, le côlon descendant ou gauche et le côlon sigmoïde), et du rectum.

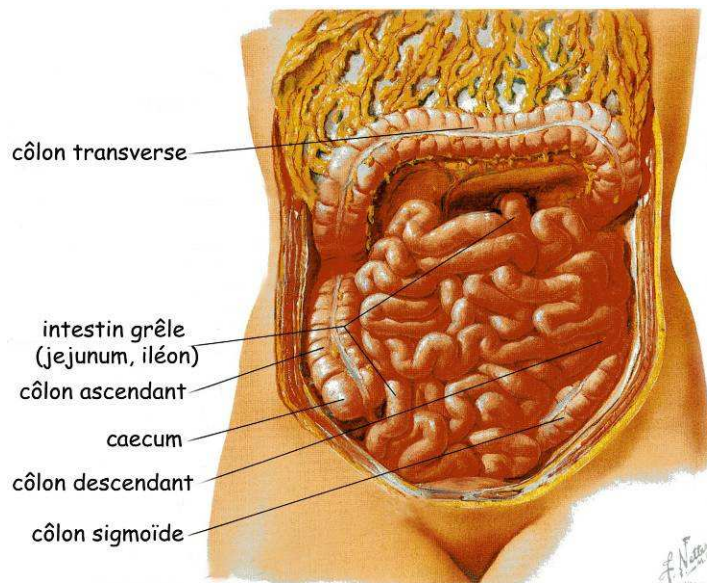


Figure 1 : anatomie de l'intestin. Adapté de l'atlas d'anatomie humaine Netter

Transversalement, l'intestin se compose de 4 tuniques : ainsi, à partir de la lumière intestinale s'enchaînent la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse.

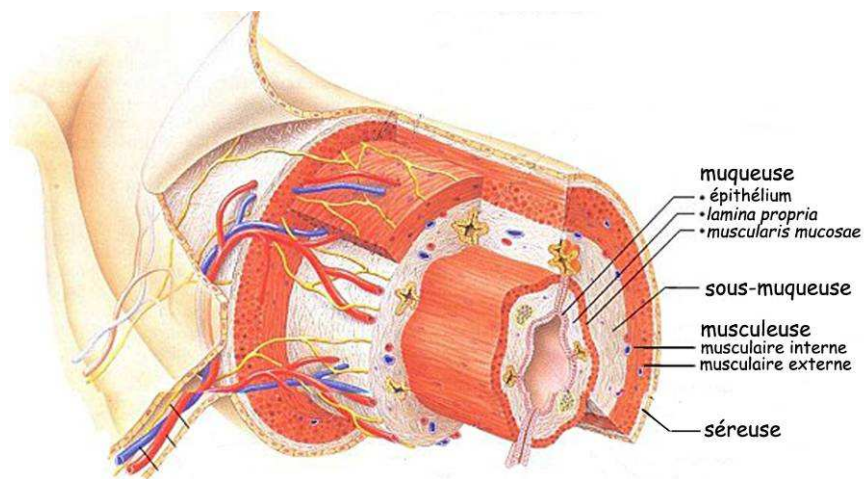


Figure 2 : les tuniques intestinales. Adapté de : <http://app-asap.over-blog.com/categorie-11150228.html>

I.1.1. Muqueuse intestinale

La muqueuse est composée d'un épithélium de surface bordant la lumière, d'un chorion conjonctif ou *lamina propria* et de la musculaire muqueuse (ou *muscularis mucosae*). Au

niveau de l'intestin grêle, elle forme des villosités augmentant la surface d'échange de l'épithélium de surface. Entre les villosités, elle forme des invaginations qui composent les cryptes de Lieberkühn. Au niveau du duodénum, la hauteur des villosités représente environ les 2/3 de la hauteur totale de la muqueuse. Les villosités sont comparativement plus longues dans le jéjunum et plus courtes dans l'iléon. Au niveau du côlon, la surface de la muqueuse est plane, dépourvue de villosités. L'épithélium de surface s'invagine pour former des glandes longues et non ramifiées.



Figure 3 : évolution de l'histologie intestinale selon l'axe proximo-distal

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium joue essentiellement un rôle absorbif, tandis qu'au niveau du gros intestin, il tient un rôle de barrière et contribue à la régulation de la composition hydro-électrolytique du bol alimentaire ; ses fonctions d'absorption y sont limitées. L'épithélium intestinal est composé de 4 types cellulaires principaux : les entérocytes, les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines qui migrent le long de l'axe des villosités pour être éliminées dans la lumière, et les cellules de Paneth, qui restent au fond des cryptes. On trouve également au niveau de ces cryptes des cellules souches qui assurent le renouvellement épithélial. Il existe par ailleurs des cellules M, qui facilitent le transfert des antigènes intestinaux vers le système lymphoïde.

Le chorion ou *lamina propria* contient des filets nerveux amyéliniques qui ont perforé la musculature muqueuse. Dans chaque villosité, la circulation sanguine s'organise autour d'une artériole, qui naît du réseau sous-muqueux, perfore la musculature muqueuse pour perdre sa média (la tunique moyenne ou couche musculuse) à la base de la villosité. Au sommet de la villosité, le vaisseau se divise en capillaires qui vont redescendre dans le chorion en s'anastomosant richement entre eux. L'axe de la villosité est occupé par un capillaire lymphatique borgne à l'extrémité de la villosité, le chylifère. Autour de celui-ci, quelques cellules musculaires lisses parcourent l'axe de la villosité depuis la musculature muqueuse. On trouve dans ce tissu conjonctif de nombreuses cellules libres, quelques polynucléaires éosinophiles, des macrophages, des lymphocytes et des plasmocytes, ainsi que des follicules lymphoïdes, qui se groupent dans les plaques de Peyer (fortement représentées dans l'iléon).

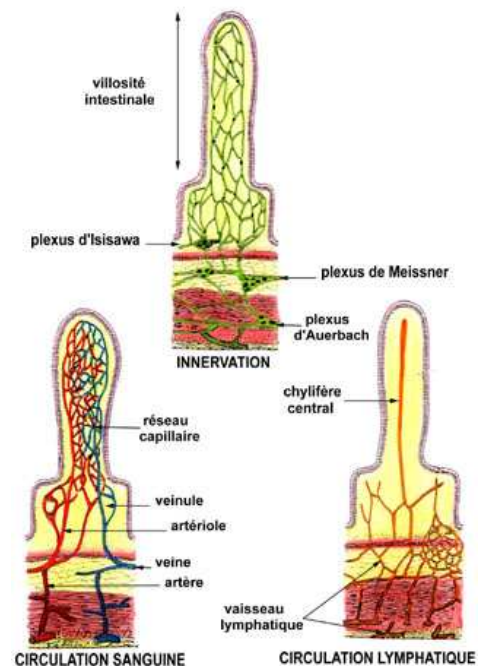


Figure 4 : innervation et vascularisation des villosités (N. Vacheret, UCB Lyon)

1.1.2. La sous-muqueuse

A la muqueuse succède une sous-muqueuse, séparées entre-elles par la *muscularis mucosae*, qui chez l'homme est constituée de deux couches de cellules musculaires lisses, et qui participe à la structure des valvules conniventes. La sous-muqueuse est constituée d'une couche conjonctive dense et riche en fibres élastiques, servant de support aux réseaux artériels, veineux et lymphatiques. Au niveau du duodénum, elle est occupée par les glandes de Brünner, qui sont des glandes muqueuses tubuleuses. Leurs sécrétions participent, avec les liquides bilio-pancréatiques, à la neutralisation du chyme acide gastrique.

1.1.3. La musculuse

La musculuse est composée de deux couches de cellules musculaires lisses : la circulaire interne et la longitudinale externe. La musculuse s'épaissit au fur et à mesure de la progression du tractus du duodénum vers le côlon. Enfin, l'intestin est entouré d'une séreuse très fine.

1.2. Principales populations cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium digestif est caractérisé par un renouvellement constant et permanent. Au niveau de l'intestin grêle, il se compartimentalise en cryptes, où l'on trouve les cellules souches, les cellules progénitrices et les cellules de Paneth, et en villosités où se trouvent 3 types de cellules différenciées (**Figure 5**). Dans le côlon, les villosités ont disparu et laissent place à des glandes coliques.

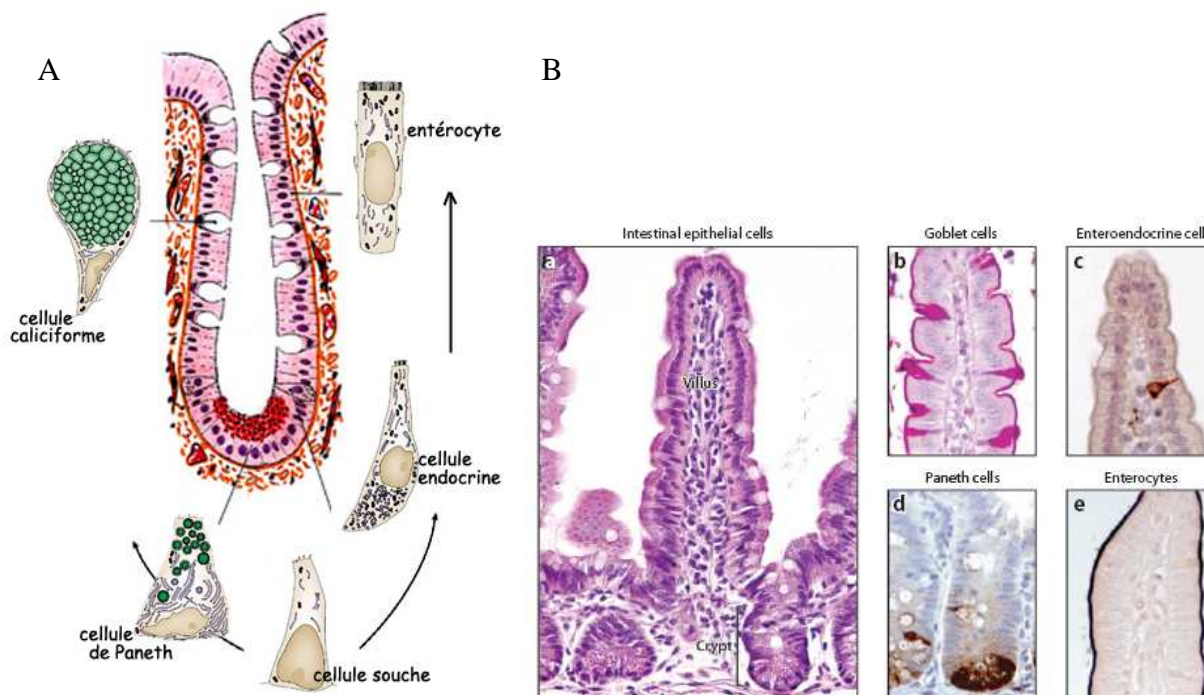


Figure 5 : les principales populations cellulaires de l'épithélium intestinal. (A) Les cellules souches, situées au fond des cryptes, vont donner naissance aux 4 types de cellules intestinales de l'intestin grêle. Les cellules endocrines, les entérocytes et les cellules caliciformes (cellules à mucus) vont migrer vers le haut des cryptes puis le long de la villosité, tandis que les cellules de Paneth vont rester au fond des cryptes. (N. Vacheret, UCB Lyon). (B) Marquage immunohistochimique des populations de cellules épithéliales intestinales : a. coloration à l'hématoxyline éosine présentant les cryptes et les villosités d'un duodénum de souris, b. marquage à l'acide périodique de Schiff des cellules à mucus, c. marquage des cellules entéroendocrines par un anticorps dirigé contre la synaptophysine, d. marquage des cellules de Paneth par un anticorps dirigé contre le lysozyme et e. marquage des entérocytes par un anticorps dirigé contre la phosphatase alcaline (van der Flier and Clevers, 2009).

1.2.1. Les cellules souches

Ce sont des cellules prolifératives qui s'autorenouvellent et produisent des cellules filles progénitrices qui sont capables de générer toutes les cellules intestinales matures. Elles sont localisées au fond des cryptes, et leur position exacte a été l'objet de nombreuses polémiques. Deux modèles ont ainsi été décrits : dans les années 50 a été proposé le modèle « +4 » où les cellules souches prennent place juste au dessus des cellules de Paneth, situées elles dans le fond de la crypte. Un autre modèle a été présenté dans les années 70, où l'observation de cellules columnaires au fond des cryptes (CBC : columnar crypt based cells) intercalées entre les cellules de Paneth laissait à penser qu'il s'agissait des véritables cellules souches intestinales. L'identification du marqueur *Lgr5* a permis de valider récemment ce modèle controversé (Barczyk et al., 2010; Barker et al., 2007). Les cellules de ces deux modèles expriment également le marqueur de cellules souches *Musashi 1* (Potten et al., 2003). Les cellules +4, qui expriment le marqueur *Bmi1*, seraient des cellules quiescentes tandis que les cellules CBC seraient continuellement actives (Li and Clevers, 2010). Ces cellules souches peuvent également devenir des cellules souches cancéreuses, et expriment alors des marqueurs spécifiques comme la prominine-1 (ou CD133) (Zhu et al., 2009).

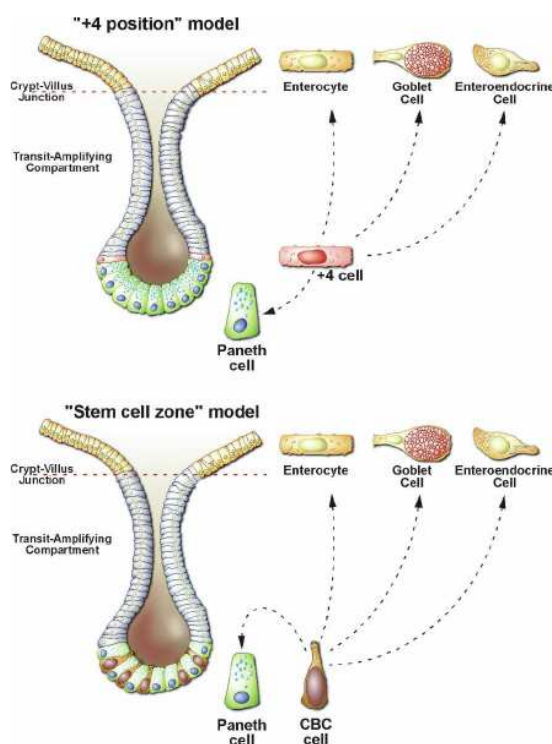


Figure 6 : les deux possibles modèles de localisation des cellules souches intestinales (Barker et al., 2008)

1.2.2. Les entérocytes

Ce sont des cellules de forme cylindrique qui constituent près de 90% de la population des cellules intestinales de l'intestin grêle. Leur pôle apical est caractérisé par la présence de nombreuses microvillosités formant une bordure en brosse, dont le rôle est d'absorber et de transférer les nutriments grâce aux enzymes présentes. Chaque microvillosité est formée par une évagination en doigt de gant de la membrane plasmique apicale, maintenue par un cytosquelette spécialisé composé principalement de protéines telles que la villine. Les nutriments absorbés sont ensuite libérés au niveau du pôle basolatéral où ils sont pris en charge par les vaisseaux sanguins du chorion. Les entérocytes se raréfient progressivement le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin. Au niveau du côlon, les colonocytes sont les équivalents des entérocytes. On les trouve au sommet des glandes où ils forment un plateau.

1.2.3. Les cellules caliciformes ou cellules à mucus

Elles constituent environ 5% de l'épithélium intestinal du grêle. Leur fonction est de protéger la muqueuse intestinale et de faciliter le transit du bol alimentaire, grâce à la présence à leur pôle apical de gouttelettes de mucus libérées par exocytose. Au niveau de l'intestin grêle, elles sécrètent des mucines acides, le plus souvent sialylées. Leur population relative augmente progressivement le long de l'intestin pour atteindre leur maximum au niveau du côlon et du rectum où elles sécrètent des mucines acides, incluant des sulfomucines normalement absentes de l'intestin grêle.

1.2.4. Les cellules entéroendocrines

Cette population ne représente qu'1% des cellules épithéliales intestinales, mais il en existe une dizaine de types différents, sécrétant chacun des hormones distinctes. Ces hormones jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale, modulant les sécrétions des organes du tractus digestif, différents aspects de la digestion et de la prolifération cellulaire. Ces cellules ont un aspect pyriforme, et leurs granules de sécrétion sont stockés au pôle basal afin d'être déversés dans la circulation sanguine. Elles sont réparties le long de l'intestin selon un gradient proximo-distal décroissant.

1.2.5. Les cellules de Paneth

Elles sont localisées dans la partie profonde des cryptes et constituent environ 4% de la population des cellules épithéliales intestinales. Ce sont des cellules pyramidales, à cytoplasme abondant très éosinophile, spécialisées dans la sécrétion de substances à action anti-bactérienne, comme le lysozyme et les défensines. Elles assurent ainsi la protection de la muqueuse intestinale et plus précisément des cellules souches dont elles sont voisines. Elles sont encore présentes en petit nombre dans le côlon droit mais disparaissent ensuite.

1.2.6. Les cellules M

Les cellules M (« microfold ») sont situées dans l'épithélium intestinal au niveau des plaques de Peyer. Elles incorporent par endocytose les antigènes endo-luminaux puis les transfèrent aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B.

1.3. Développement intestinal

Le tube digestif primitif s'établit vers le 5^{ème} jour du développement chez la souris. Il est composé par une couche interne d'endoderme entouré par une couche de mésenchyme. Le développement de l'intestin se déroule selon trois axes : un axe temporel, un axe cranio-caudal (de la bouche vers l'anus) et un axe crypto-villositaire (de la séreuse vers la lumière intestinale) (**Figure 7**).

1.3.1. Développement selon l'axe cranio-caudal

Le développement du tractus digestif est initié lors de la gastrulation, par deux invaginations de l'endoderme, qui forment l'intestin antérieur et l'intestin postérieur. Ces deux tubes borgnes sont fermés à l'avant par la membrane pharyngienne qui se percera pour former le stomodeum (future bouche), et à l'arrière par la membrane cloacale qui se rompra afin de former le cloaque. Les deux invaginations vont progressivement se rejoindre vers le milieu de l'embryon, au niveau du canal vitellin, et donnent naissance à l'intestin moyen.

1.3.1.1. Développement de l'intestin antérieur

L'intestin antérieur donne naissance à l'œsophage, à la trachée et aux bronches, ainsi qu'à l'estomac et à la partie du duodénum située en amont de l'abouchement des voies biliaires. De plus, le foie, le pancréas et les voies biliaires se développent à partir de bourgeons provenant du duodénum. Le duodénum sera formé par la partie terminale de l'intestin antérieur et la partie craniale de l'intestin moyen.

1.3.1.2. Développement de l'intestin moyen

Le développement rapide de l'intestin moyen résulte en la formation d'une anse intestinale primitive, qui communique à son sommet avec la vésicule ombilicale par l'intermédiaire du canal vitellin. La branche craniale de cette anse donnera le segment distal du duodénum, le jéjunum et une partie de l'iléon, tandis que la branche caudale donnera la partie inférieure de l'iléon, le caecum et l'appendice, le côlon ascendant et les deux tiers proximaux du côlon transverse. Au cours du développement, l'anse intestinale primitive va effectuer une rotation autour de l'axe de l'artère mésentérique supérieure, permettant au jéjunum et à l'iléon de former des flexuosités, les anses intestinales. Le gros intestin va quant à lui s'allonger en restant rectiligne. Ces anses intestinales s'allongent rapidement, et créent durant le développement une hernie ombilicale physiologique, avant de réintégrer la cavité abdominale vers le stade E15 de développement chez la souris.

1.3.1.3. Développement de l'intestin postérieur

L'intestin postérieur va donner naissance au tiers distal du côlon transverse, au côlon descendant, au sigmoïde et au rectum, ainsi qu'à la partie supérieure du canal anal.

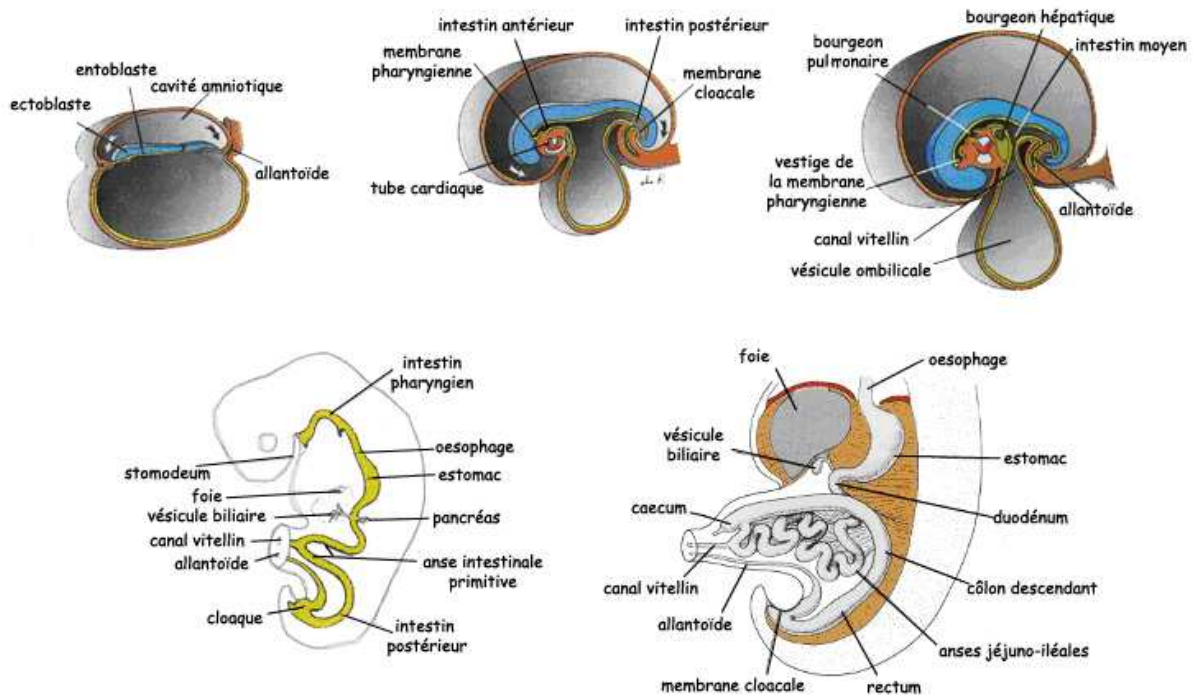


Figure 7 : les différents stades de développement de l'intestin primitif. Adapté d' « Embryologie médicale » Langman et Sadler, 6^{ème} édition, éditions Pradel.

1.3.2. Développement selon l'axe crypto-villositaire

L'axe crypto-villositaire va faire intervenir les interactions entre l'endoderme et le mésoderme. L'épithélium intestinal s'initie à partir d'une couche pseudostratifiée d'origine endodermique qui prolifère activement (**Figure 8**). Chez la souris, il est converti en épithélium simple autour du 14^{ème} jour de développement, alors que les cellules mésenchymateuses commencent à s'agréger et à envoyer des projections vers la lumière, provoquant ainsi l'émergence des villosités intestinales.

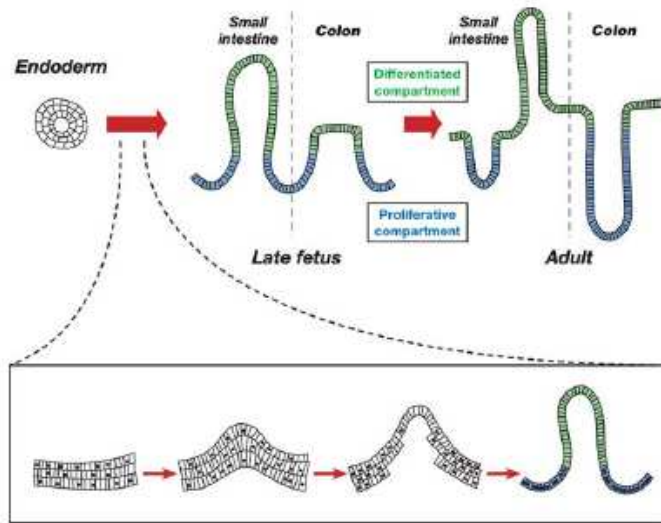


Figure 8 : développement selon l'axe crypto-villositaire. Au cours du développement, l'épithélium pluristratifié devient un épithélium simple, et des villosités vont progressivement émerger dans les stades tardifs. Les cryptes vont progressivement se creuser peu après la naissance (Sancho et al., 2004)

1.3.2.1. Différenciation de l'endoderme en épithélium intestinal

Chez la souris, à partir du 14^{ème} jour de développement, l'endoderme va commencer à se différencier (**Figure 19**). Il est tout d'abord converti en épithélium simple avec des cellules indifférenciées. Ces cellules vont se différencier progressivement et se polariser en exprimant à leur pôle apical des enzymes digestives et des transporteurs et à leur pôle basal des récepteurs pour les éléments de la lame basale. Les entérocytes sont les premiers types cellulaires spécialisés à émerger, suivi par les cellules entéroendocrines et à mucus. Les cryptes font leur apparition vers le 19^{ème} jour de développement, en parallèle à la différenciation des cellules de Paneth.

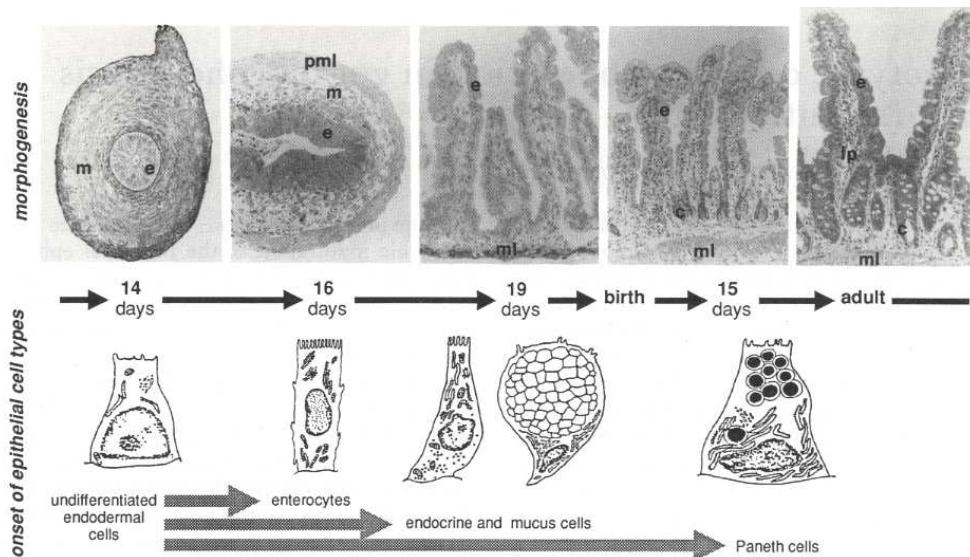


Figure 9 : mise en place de la morphologie de l'épithélium intestinal et apparition des types cellulaires spécialisés selon l'axe temporel (Simon-Assmann and Kedinger, 1993)

A cette différenciation morphologique s'associe l'expression des enzymes digestives comme la lactase par exemple, qui peuvent servir de marqueurs de différenciation. Chez la souris, l'épithélium intestinal atteint son architecture et sa fonctionnalité mature 4 semaines environ après la naissance.

1.3.2.2. Différenciation du mésenchyme

Les cellules mésenchymateuses vont également commencer leur différenciation vers le 14^{ème} jour de développement. Certaines cellules vont initier l'émergence des villosités en envoyant des projections vers la lumière afin de former la *lamina propria*, et elles se différencieront en fibroblastes de la muqueuse et en myofibroblastes péricryptaux. Les autres cellules mésenchymateuses se différencieront en cellules musculaires lisses, et vont exprimer progressivement les marqueurs spécifiques que sont la desmine ou l' α -actine de muscle lisse par exemple (Sancho et al., 2004; Simon-Assmann and Kedinger, 1993).

1.3.3. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement et l'homéostasie de l'intestin

Le développement de l'intestin est soumis à deux classes de facteurs de transcription : ceux qui interviennent dans le développement structural, et ceux qui régulent la cytodifférenciation fonctionnelle des cellules.

Le développement structural est principalement dirigé par les facteurs de transcription homéotiques Hox (pour revues, voir Grapin-Botton and Melton, 2000; McLin et al., 2009). De nombreux facteurs de transcription sont nécessaires pour établir la complexité cellulaire de l'intestin mature. Ces facteurs sont spécifiques de chaque segment intestinal. Ainsi, au niveau terminal de l'intestin antérieur et du début de l'intestin moyen (partie qui donnera naissance à l'estomac, au pancréas et au duodénum) on trouvera des facteurs de transcription tels que *Pdx1*, *Pax4* et *6*, *Nkx2.2*, *Isl-1* et *NeuroD*. Chez les vertébrés, au niveau de l'intestin postérieur qui donnera une partie de l'intestin grêle et le gros intestin, ce sont essentiellement les gènes homologues du gène de drosophile *caudal* (*Cdx1* et *Cdx2*) et les gènes du cluster *Hoxd* qui gouvernent le développement.

Afin d'étudier l'effet exact de ces différents gènes sur le développement, des souris invalidées pour la plupart d'entre eux ont été créées. Par exemple, les souris invalidées pour *Pdx1* n'ont pas de pancréas ni certains types de cellules endocrines dans l'estomac et le duodénum (Offield et al., 1996). Le gène homéotique *Cdx2* est exprimé dans les structures postérieures comme le côlon. Les souris invalidées pour ce gène meurent au stade embryonnaire E3,5 (Chawengsaksophak et al., 1997). Pour pallier cette létalité, une approche d'invalidation conditionnelle a montré que la perte de *Cdx2* dans l'intestin grêle conduit celui-ci à adopter une identité stomacale (Grainger et al., 2010). Par ailleurs, cette déficience en *Cdx2* affecte également l'organisation du cytosquelette d'actine des microvillosités, conduisant à une sévère atrophie des microvillosités ; *Cdx2* régulant la polarité des cellules épithéliales (Gao and Kaestner, 2010). Les mutations de *Cdx2* entraînent chez l'homme et la souris une perte du contrôle de la croissance de l'intestin ainsi que la formation de tumeurs coliques (Simon-Assmann et al., 2010a; Wicking et al., 1998).

L'identité particulière des cellules ainsi que leur homéostasie et la régulation des cellules souches sont quant à elles régulées par les voies Notch, Wnt, PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), BMP (bone morphogenetic protein) et Hedgehog (pour revues voir, Crosnier et al., 2006; Scoville et al., 2008).

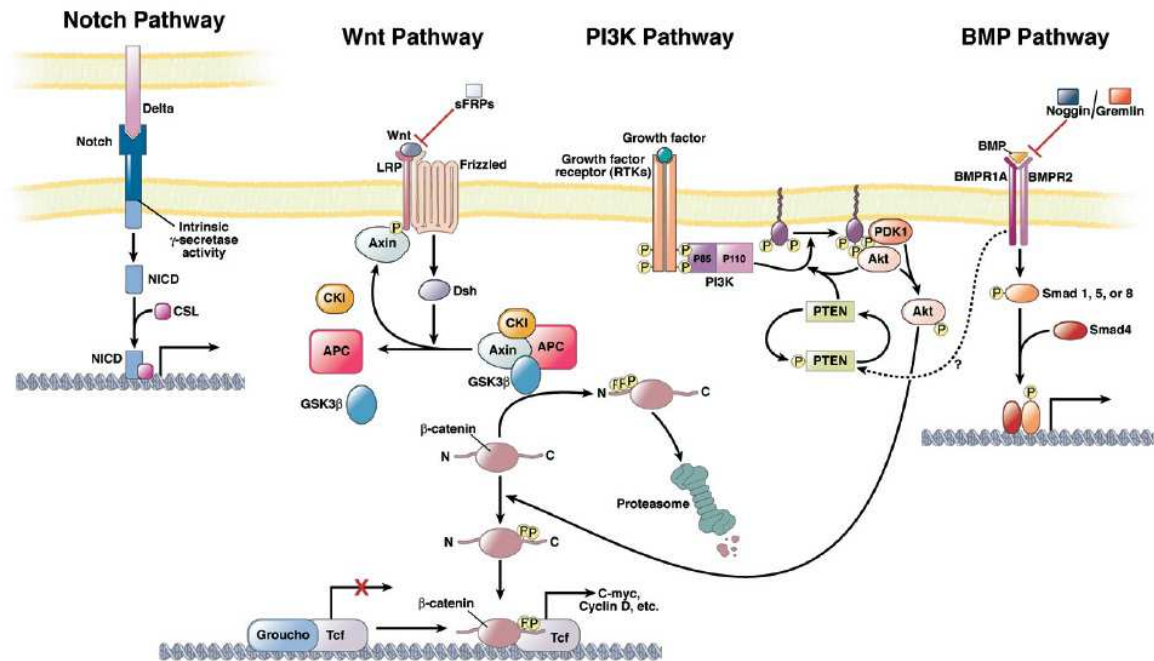


Figure 10 : les différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation et l'homéostasie des cellules des cryptes intestinales (Scoville et al., 2008).

La voie **Notch** (**Figure 10**) est particulièrement importante dans la régulation de la prolifération ainsi que dans la détermination du lignage dans l'intestin. Lors de son activation, son ligand principal, Delta, se fixe sur le récepteur Notch qui est alors clivé par une γ -sécrétase et se transloque dans le noyau pour induire l'expression de son effecteur Hes1 qui est un facteur de transcription bHLH (basic helix-loop-helix) et qui va activer des gènes cibles qui régulent la prolifération et la différenciation. Par exemple, une mutation causant une activation constitutive de cette voie entraîne une perte de tout le lignage sécrétoire (Fre et al., 2005).

La voie **Wnt** (**Figure 10**) joue un rôle majeur dans le développement et le renouvellement de l'épithélium intestinal (Clevers, 2006) : elle permet de maintenir l'homéostasie des cellules souches/progénitrices en contrôlant le cycle cellulaire, en inhibant la différenciation et en contrôlant la migration des cellules le long de l'axe crypto-villositaire. L'activation de la voie Wnt se présente selon un gradient décroissant au niveau de l'axe crypto-villositaire. Il existe deux voies Wnt : la voie canonique et la non-canonique. La voie canonique est la voie la mieux décrite dans l'intestin. En absence de signal Wnt, la β -caténine cytosolique (qui n'est plus impliquée dans le complexe de jonction intercellulaire) est séquestrée par un complexe et sera détruite via le protéasome. Ce complexe est composé du suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli), d'axine, de caséine kinase I et de glycogène synthase kinase 3β . Lors de l'activation de la voie Wnt, l'un des 19 ligands Wnt décrits va se lier sur le complexe formé par le récepteur Frizzled et un co-récepteur de type LRP (lipoprotein-related protein). Le complexe qui séquestre normalement la β -caténine sera alors inactivé, à priori via le facteur Disheveled qui recruterait l'axine au niveau du récepteur Frizzled. La β -caténine pourra alors passer dans le noyau et lier le facteur de transcription TCF/LEF (pour lymphoid enhancer factor) en remplaçant le co-répresseur Groucho. Le complexe ainsi formé va pouvoir activer les gènes cibles de la voie Wnt, comme par exemple des gènes activateurs de la prolifération. La voie Wnt contrôle ainsi la prolifération des cellules dans les cryptes et on comprend qu'une dérégulation de l'un de ces composants remet en cause un équilibre qui pourra alors basculer dans un processus tumoral, comme c'est le cas par exemple lors des mutations du gène APC qui sont les causes les plus fréquentes de cancer colorectal.

La voie **PI3K** joue un rôle important dans la survie cellulaire, la prolifération et la croissance cellulaire (ainsi que dans la tumorigenèse) (**Figure 10**). L'activation de cette voie va entraîner la phosphorylation de son principal effecteur Akt, une serine/thréonine kinase. L'activation d'Akt est inhibée par la protéine PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). Akt a de nombreuses cibles ayant des effets anti-apoptotiques, ou augmentant la survie cellulaire : par exemple, Akt peut activer Mdm2, ce qui a pour effet de diminuer le niveau de p53, élément clé de la régulation du cycle cellulaire (Scoville et al., 2008). Par ailleurs, de nouvelles études tendent à montrer que la voie PI3K pouvait converger vers la voie Wnt. En effet, la forme activée d'Akt peut induire la phosphorylation de la β -caténine (He et al., 2004; He et al., 2007), et cette phosphorylation pourrait se coordonner avec le signal Wnt pour augmenter l'activité nucléaire de la β -caténine.

La voie **BMP** fait partie de la famille des TGF β (transforming growth factor β) et va inhiber la formation des cryptes (**Figure 10**). L'activation de cette voie entraîne une phosphorylation des protéines effectrices Smad. Une fois phosphorylée, la protéine Smad1, 5 ou 8 s'associe avec Smad4 pour former un complexe hétérotrimérique qui va pouvoir se transloquer dans le noyau et activer la transcription. C'est une voie qui va réguler l'épithélium intestinal à partir du mésenchyme : les effecteurs, comme par exemple BMP4, sont exprimés dans le mésenchyme et régulés positivement par la voie Hedgehog, tandis que leurs récepteurs sont exprimés dans les cellules épithéliales (Crosnier et al., 2006). L'activation de cette voie est forte au niveau de l'épithélium des villosités, tandis qu'elle est réprimée par son antagoniste noggin dans la région des cryptes. La voie BMP joue un rôle important au niveau de la différenciation terminale du lignage sécrétoire ; en effet, des souris invalidées pour le récepteur BMP de type 1A présentent des défauts de la différenciation terminale des cellules du lignage sécrétoire, mais pas de défauts de détermination du devenir cellulaire (Auclair et al., 2007).

La voie **Hedgehog** permet quant à elle de démarquer les villosités des cryptes. L'expression des deux ligands Sonic Hedgehog (Shh) et Indian Hedgehog (Ihh) est restreinte à l'épithélium et se concentre progressivement à la région intervallositaire au fur et à mesure de la progression de la morphogénèse. Les récepteurs de cette voie sont les molécules patched 1 et 2 ; ils se trouvent au niveau du mésenchyme sous-jacent, de même que les effecteurs Gli. La voie de signalisation Hedgehog est d'une part cruciale pour un développement correct du mésenchyme autour du tube formé par l'endoderme, mais également pour le comportement des cellules épithéliales. En effet, une inhibition de cette voie conduit à une absence de villosités et à la persistance d'un épithélium intestinal fortement prolifératif et parfois pseudostratifié, avec une activation accrue de la voie Wnt et un déficit de cellules différenciées (Madison et al., 2005).

1.3.4. Les interactions épithélio-mésenchymateuses lors du développement (pour revue, voir Simon-Assmann et al., 2010a)

Les interactions entre l'endoderme et le mésenchyme sont particulièrement importantes lors du développement. En effet, la spécification de l'endoderme intestinal primitif se fait grâce aux interactions avec le mésoderme latéral. Les interactions entre ces deux feuilletts se font via la lame basale, par le biais de récepteurs situés la partie basale des cellules épithéliales et au niveau de la membrane des cellules du mésenchyme.

Pour comprendre le rôle respectif de l'endoderme et du mésenchyme dans la morphogénèse et la différenciation intestinale, des modèles de coculture *in vitro* et d'associations *in vivo* (le plus souvent inter-espèces) ont été développés (Simon-Assmann et al., 2009; Yasugi and Mizuno, 2008). Ainsi, des expériences de recombinaison tissulaire entre de l'endoderme et du

mésenchyme d'intestins fœtaux provenant de différentes espèces (poulet, souris, rat) ont pu montrer le rôle permissif du mésenchyme intestinal sur la morphogenèse et l'implantation villositaire. Ce mésenchyme peut également jouer un rôle instructif puisqu'un mésenchyme d'intestin grêle associé à de l'endoderme colique va induire la production de saccharase-isomaltase, enzyme pourtant spécifique de l'intestin grêle (Kedinger et al., 1998). Par ailleurs, la recombinaison entre du mésenchyme intestinal et des cellules intestinales épithéliales des cryptes indifférenciées et greffée à la souris a permis de montrer que le mésenchyme était capable d'induire la morphogenèse de villosités incluant tous les types de cellules épithéliales ; ceci prouve en outre que des cellules souches pluripotentes présentes dans certaines lignées établies ont besoin d'un microenvironnement adéquat (matrice extracellulaire, cytokines...) pour se différencier (Kedinger et al., 1986).

1.4. Fonction digestive de l'intestin

La fonction première de l'intestin est la digestion, qui permet de dégrader les aliments en nutriments utilisables par l'organisme. Cette dégradation se fait par des moyens mécaniques et par des enzymes sécrétées tout au long du tube digestif. Trois étapes caractérisent la digestion : tout d'abord une étape « motrice » où les aliments subissent des modifications mécaniques et sont mêlés aux sécrétions digestives, puis une étape « d'absorption » où les nutriments seront acheminés de la lumière digestive vers le milieu intérieur, et enfin une étape « d'excrétion » où les déchets seront éliminés.

1.4.1. Digestion enzymatique et absorption des nutriments

L'intestin est le siège principal de l'absorption des nutriments. Le duodénum reçoit le chyme gastrique contenant les enzymes digestives contenues dans la salive et l'estomac. Il sécrète des hormones telles que la sécrétine, qui va neutraliser l'acidité du chyme, et la cholécystokinine (CCK) qui stimule l'activité du pancréas et de la vésicule biliaire. Au niveau du duodénum, le bol alimentaire est mélangé avec les sécrétions pancréatique et biliaire. Les enzymes produites par ces deux organes s'ajoutent alors au chyme dans le duodénum. Parmi les enzymes pancréatiques, 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. Les sucres sont ainsi transformés en disaccharides, les protéines en peptides de plus en plus petits et les lipides en micelles.

L'étape d'absorption a lieu au niveau des entérocytes (**Figure 11**). Grâce aux enzymes présentes au niveau des microvillosités, les disaccharides sont réduits en monosaccharides par les disaccharidases (comme la saccharase-isomaltase). Les monosaccharides ainsi obtenus entrent dans la cellule par transport actif puis traversent la membrane basale des cellules intestinales, puis celle des capillaires sanguins du chorion et seront transportés jusque dans le foie. Des oligopeptidases transforment les peptides en acides aminés. Les micelles contenant des acides gras (à chaînes courtes) et des monoglycérides passent dans les cellules intestinales par diffusion et seront resynthétisés au niveau du réticulum endoplasmique en triglycérides et phospholipides qui seront enveloppés par des lipoprotéines pour former des chylomicrons. Ceux-ci sont expulsés de la cellule par exocytose. Les acides gras à chaînes longues sont quant à eux pris en charge par des transporteurs transmembranaires et ensuite par des transporteurs cytosoliques de type FABPs (Fatty Acid Binding Proteins) chargés de les diriger vers les sites de stockage ou d'oxydation. L'absorption a lieu tout au long de l'intestin grêle mais est particulièrement active au niveau du jéjunum et de l'iléon où la surface d'échange est la plus grande.

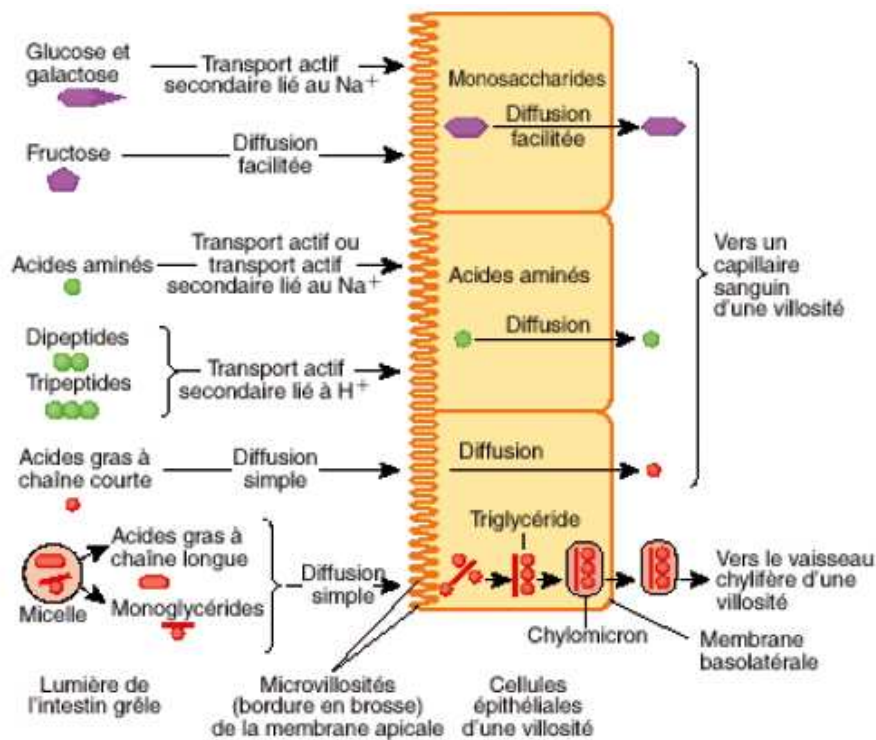


Figure 11 : schéma illustrant l'absorption des nutriments par les entérocytes (tiré de Tortora et Grabowski, Principes d'Anatomie et de Physiologie, édition DeBoeck). Les mono et disaccharides ainsi que les acides aminés et les peptides requièrent un transport actif faisant appel à des ions Na^+ ou H^+ . Les acides gras à chaînes courtes ou sous forme de micelles entrent dans la cellule par diffusion simple. Les nutriments absorbés sortent ensuite de la cellule pour être transportés vers le foie au moyen des capillaires sanguins contenus dans la villosité (saccharides et peptides/acides aminés) ou du chylifère central vers des vaisseaux lymphatiques pour aboutir dans le conduit thoracique (vaisseau lymphatique drainant la majorité de la lymphe du corps) pour la majeure partie des acides gras et du glycérol.

1.4.2. Elimination des résidus et réabsorption de l'eau

Le côlon a quant à lui principalement un rôle d'absorption de l'eau et des électrolytes pour la partie proximale, et de stockage et d'élimination des déchets pour la partie distale.

1.4.3. Contrôle endocrinien de la digestion

Les cellules entéroendocrines de l'intestin sécrètent des hormones qui vont entre autres contrôler la digestion. Il existe 15 types de cellules endocrines actuellement décrites dans l'épithélium intestinal. Parmi elles, on trouve les cellules à sérotonine (contraction du muscle lisse, rôle dans le péristaltisme), à entéroglucagon, à gastrine (stimulation de la sécrétion pancréatique, contraction du muscle lisse), à somatostatine, à sécrétine, ou à cholécystokinine (stimulation des sécrétions pancréatiques et biliaires).

1.4.4. La flore digestive

Dans la fonction digestive de l'intestin, on notera l'importance de la flore microbienne. On y trouve en effet 99% des bactéries de l'organisme ; jusqu'à 1 million dans le grêle, 1 milliard par ml dans le cæcum et mille milliards dans le côlon gauche (Macfarlane et al., 2009). Ce sont des germes majoritairement anaérobies qui dégradent les peptides endogènes issues de la desquamation cellulaire grâce à des peptidases bactériennes ; elles permettent également la dégradation en acides aminés et la désamination ou décarboxylation avec production d'ammoniaque ou d'amines volatiles (rôle dans la trophicité de la muqueuse du côlon). Les

bactéries présentes dégradent également par fermentation les glucides non absorbés par l'intestin grêle.

1.5. La barrière intestinale muqueuse

1.5.1. Généralités

L'épithélium intestinal forme une barrière essentielle pour la muqueuse. En effet, la barrière doit protéger la muqueuse des aliments et de la communauté bactérienne présents dans la lumière de l'intestin. Chaque type cellulaire, cellule entéroendocrine, cellule à mucus, cellule de Paneth, entérocyte ou cellule M contribue à cette fonction de barrière. Comme nous l'avons vu précédemment, l'épithélium intestinal subit un renouvellement rapide et perpétuel : ce renouvellement se fait à partir de cellules souches multipotentes qui expriment *Lgr5* et sont localisées au fond des cryptes de Lieberkühn (Barker et al., 2007; Sato et al., 2009). Les cellules ainsi formées vont migrer le long des glandes/villosités et être éliminées par apoptose et desquamation dans la lumière intestinale. Ce processus de renouvellement continu se fait sans interruption fonctionnelle des jonctions cellule-cellule. L'intégrité de ces jonctions est particulièrement importante pour l'homéostasie du système immunitaire, car de nombreux microbes et antigènes alimentaires se trouvent dans la lumière intestinale à la surface de la barrière muqueuse. Le film muqueux sécrété par les cellules caliciformes est un élément clé de la barrière. Il forme à la fois un filtre physique mais également un filtre chimique contre les pathogènes car il contient des peptides anti-microbiens (McGuckin et al., 2009). Mais c'est également une source de nutriment et un microhabitat pour les bactéries du microbiome naturellement présent dans la lumière intestinale.

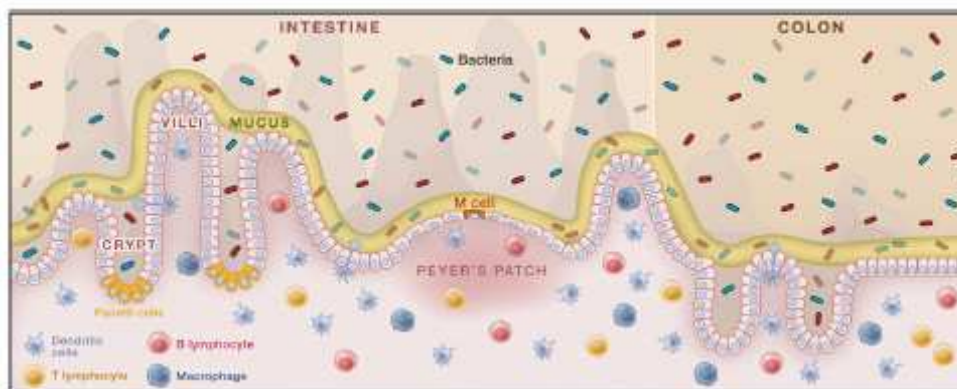


Figure 12 : représentation de la barrière intestinale muqueuse et de la microflore (Garrett et al., 2010).

1.5.2. Microbiome et altération de la barrière muqueuse

La barrière muqueuse permet d'empêcher les bactéries commensales et les pathogènes de pénétrer dans la muqueuse intestinale. Au niveau de l'intestin grêle, on trouve essentiellement des streptocoques, des staphylocoques et des lactobacilles. La flore colique est quant à elle extrêmement variée et abondante : on trouve des Bactéroïdes, des Bifidobactérium ou des Clostridium ainsi que des Entérobactéries (*E.coli*, *Proteus*, *Klebsielle*...), des Entérocoques et des Staphylocoques. Cette flore est habituellement stable et limite l'implantation d'espèces pathogènes telles que *Salmonelle*, *Shigelle* ou *Campylobacter*. En effet, il a été décrit qu'une dérégulation de la flore intestinale peut participer à des pathologies digestives, et notamment à l'entretien de l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Swidsinski et al., 2009). Les liposaccharides complexes qui forment la membrane externe des bactéries Gram négatives sont fortement immunogènes, et peuvent pénétrer la barrière

intestinale si celle-ci est altérée, exposant ainsi la lamina propria, ce qui peut soit initier l'inflammation, soit contribuer à l'entretenir (Macfarlane et al., 2009).

Les pathogènes profitent de toutes les opportunités pour franchir la barrière au travers des jonctions cellulaires. Par exemple, les adénovirus se lient à un récepteur CAR (Coxsackie B and adenovirus receptor) qui co-localise avec la protéine de jonction serrée ZO-1 (Raschperger et al., 2006). Les entéropathogènes comme *Salmonella typhimurium* altèrent la barrière en sécrétant des toxines qui ciblent les protéines de jonction ou le cytosquelette associé aux jonctions. Les cytokines inflammatoires peuvent moduler le renouvellement de l'épithélium pour stimuler la défense. NF- κ B, l'un des régulateurs majeurs de la réponse immunitaire, fonctionne de façon basale pour assurer un continu remplacement épithélial et l'intégrité de la barrière. Sous certaines conditions inflammatoires, il peut accélérer le renouvellement comme mécanisme de défense. Une déficience d'NF- κ B chez la souris résulte en une expression réduite de peptides anti-microbiens et en une augmentation de l'apoptose des entérocytes, ce qui conduit à une brèche dans la barrière muqueuse et à des translocations bactériennes (Nenci et al., 2007). Chez la souris, une augmentation de la perméabilité intestinale peut précéder le développement d'inflammations intestinales (Olson et al., 2006).

1.5.3. Rôle du mucus et des mucines

Le mucus sécrété par les cellules caliciformes joue un rôle important dans la barrière intestinale et dans la lubrification de l'épithélium. Il permet de piéger les pathogènes, et il a été démontré une augmentation de ses composants lors de certaines affections bactériennes. Chez le rongeur, des expériences d'imagerie ont permis de mesurer l'épaisseur de la couche muqueuse au niveau du côlon : elle mesure environ 800 μ m, et se compose d'une couche d'environ 100 μ m très adhérente, directement au contact des cellules épithéliales, et d'une couche de 700 μ m moins dense et moins adhérente (Atuma et al., 2001). La couche interne est plus ou moins stérile (Swidsinski et al., 2007).

Les principaux composants de la couche de mucus sont les mucines. Ce sont des protéines glycosylées qui entrent dans la composition du mucus. Elles sont codées chez l'homme par 19 gènes. MUC2 est la mucine la plus abondante du mucus intestinal. Les souris invalidées pour MUC2 développent spontanément des inflammations chroniques dans la partie distale de leur intestin, mimant les rectocolites hémorragiques de l'humain (Van der Sluis et al., 2006). De plus, ces souris génétiquement déficientes pour MUC2 développent également des tumeurs au niveau de l'intestin grêle, du côlon et du rectum vers l'âge de 6 mois (Velcich et al., 2002). Velcich et collègues (2002) ont également pu démontrer que ces souris présentaient des altérations de la prolifération, de la migration et de l'apoptose : en effet, la prolifération et la survie des cellules épithéliales sont augmentées lors de la perte de MUC2, ce qui peut provoquer comme conséquence directe une exposition accrue des cellules au contenu de la lumière intestinale et peut ainsi présenter un environnement favorable à l'initiation et la progression de tumeurs.

Le patron d'expression des mucines est organe dépendant comme décrit dans le **tableau 1** : ainsi, MUC 2 est spécifique de l'intestin grêle et du côlon, et MUC5AC et MUC6 sont plutôt restreints à l'estomac. Il existe plusieurs classes de mucines : neutre (détectée en histochimie par l'acide périodique de Schiff), acide (sialomucine, détectée en histochimie par le bleu alcian à pH2,5) et acide sulfaté (sulfomucine, détectée par le bleu alcian à pH0,5) (**Tableau 2**).

Mucines	Localisation				
	estomac		intestin grêle		côlon et rectum
	surface	glandes	cellules caliciformes	glandes de Brünner	cellules caliciformes
MUC1	+	+	+/-	-	+/-
MUC2	-	-	+	-	+
MUC3	-	-	+	-	+
MUC4	-	-	+/-	-	+
MUC5AC	+	-	-	-	-
MUC5B	+	-	+/-	+	+/-
MUC6	-	+	-	+	-

Tableau 1 : distribution des mucines le long du tractus digestif, adapté de « Gastroentérologie » édition Ellipses G Cadiot, JP Galmiche, C Matuchansky et M Mignon. A noter que les mucines 12, 13, 17 et 20 (non représentées dans le tableau) sont présentes sur toute la longueur du tractus.

Mucines	Localisation						
	estomac		intestin grêle			côlon	
	fundus	antre	duodénum	jéjunum	iléon	côlon	rectum
neutres	+	+	-	-	-	-	-
sialomucines N-acétylées	+/-	+/-	+	+	+	+	-
sialomucines O-acétylées	+/-	+/-	+	-	+	+	+
sulfomucines	+/-	+/-	-	-	+	+	+

Tableau 2 : distribution des principales classes de mucines le long du tractus digestif, adapté de « Gastroentérologie » édition Ellipses G Cadiot, JP Galmiche, C Matuchansky et M Mignon.

II. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

II.1. Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ne sont plus des maladies rares, elles touchent en effet plus d'un sujet sur 1000 (chiffre de 2005) dans les pays occidentaux comme la France, où l'incidence de la maladie de Crohn, notamment pédiatrique, ne cesse d'augmenter.

Les MICI regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces deux maladies diffèrent par leur distribution, leurs caractéristiques macroscopiques et histologiques et leur facteur de risque. Néanmoins, la distinction entre maladie de Crohn et rectocolite n'est pas toujours évidente, et environ 10% des patients atteints de MICI ont une colite dite indéterminée, malgré l'apport des nouveaux marqueurs utilisés pour le diagnostic différentiel. L'origine des MICI n'est pas encore totalement déterminée ; il s'agit d'une anomalie de la réponse immunitaire au niveau de l'intestin vis-à-vis de composants de la flore bactérienne survenant chez des sujets génétiquement prédisposés. La recherche a permis de déterminer des gènes de susceptibilité de la maladie de Crohn : en 2001 le gène *NOD2/CARD15* a été le premier à être identifié comme un facteur de risque : il code pour une molécule du système immunitaire inné impliquée dans la reconnaissance par l'hôte de signaux bactériens, confirmant l'importance du rôle de la réponse immunitaire dans ces maladies (Hugot et al., 2001). D'autres gènes ont depuis été ajoutés, dont des gènes qui codent pour des molécules

exprimées dans l'épithélium intestinal, à l'interface entre la flore bactérienne et la muqueuse. La maladie de Crohn serait donc une pathologie de la barrière intestinale.

Les MICI évoluent habituellement de façon intermittente, avec des périodes de rémission plus ou moins prolongées. Les phases inflammatoires alternent donc avec des périodes d'accalmie. Rarement, la maladie évolue de façon quasi continue (on parle alors de formes « chroniques actives »), en laissant toujours place à des périodes d'accalmie relative. L'expression clinique des MICI est dans la plupart des cas essentiellement digestive, et la localisation des lésions intestinales conditionne l'allure générale des symptômes : les douleurs abdominales sont prédominantes dans les atteintes digestives hautes de la maladie de Crohn, alors que les diarrhées sont en général au premier plan au cours des maladies de Crohn coliques ou des rectocolites. Les manifestations extra-digestives des MICI sont communes aux deux pathologies : elles accompagnent souvent les poussées inflammatoires et se présentent sous forme d'atteintes articulaires périphériques (c'est-à-dire touchant principalement les membres), de lésions dermatologiques ou de lésions oculaires. Elles peuvent dans certains cas constituer de véritables maladies associées évoluant à leur propre compte (par exemple un rhumatisme axial, c'est-à-dire touchant la colonne vertébrale et les articulations sacro-iliaques).

Les principaux traitements des MICI sont l'administration de salicylés, de corticoïdes, d'antibiotiques, d'anti-TNF α (tumor necrosis factor) et d'immunosuppresseurs. Les salicylés sont principalement représentés par des dérivés du 5-ASA (acide 5-aminosalicylique) comme la mésalazine. Ils exercent une action anti-inflammatoire locale directe sur les muqueuses de l'intestin grêle et du côlon des patients. Les corticoïdes ont également une action anti-inflammatoire. Les antibiotiques permettent de lutter contre l'éventuelle cause bactérienne de la poussée. L'un des anti-TNF α le plus utilisé est l'infliximab. C'est un anticorps chimérique (mi-humain, mi-souris) dirigé contre le TNF α , élément clé du processus inflammatoire. Dans les cas les plus sévères ne répondant pas au traitement médicamenteux, seule la chirurgie permet de soigner le patient par résection des zones ulcérées (pour revues voir, Beaugerie, 2005; Lemann and Allez, 2005).

II.2. Caractères distinctifs de la maladie de Crohn (MC) et de la Rectocolite hémorragique (RCH)

La maladie de Crohn est une MICI qui peut toucher l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus, par des lésions de types discontinues. 3 segments sont toutefois plus souvent atteints : l'iléon terminal, le côlon et la région du rectum et de l'anus. Les lésions intéressent l'ensemble de la paroi intestinale (c'est-à-dire qu'elles peuvent être transmursales), impliquant la survenue fréquente d'une sténose (rétrécissement du tube intestinal, de type inflammatoire lors des poussées, en général secondaire à l'œdème pariétal local, ou de type cicatriciel, résultant alors de la fibrose des couches atteintes) et de fistules (communications anormales entre deux canaux, ou entre un canal et la peau). La rectocolite hémorragique, quant à elle, se caractérise par une atteinte continue de la muqueuse digestive dans la région côlon/rectum/anus, le rectum étant toujours atteint. Dans cette affection, les sténoses sont rares et on ne trouve pas de fistule.

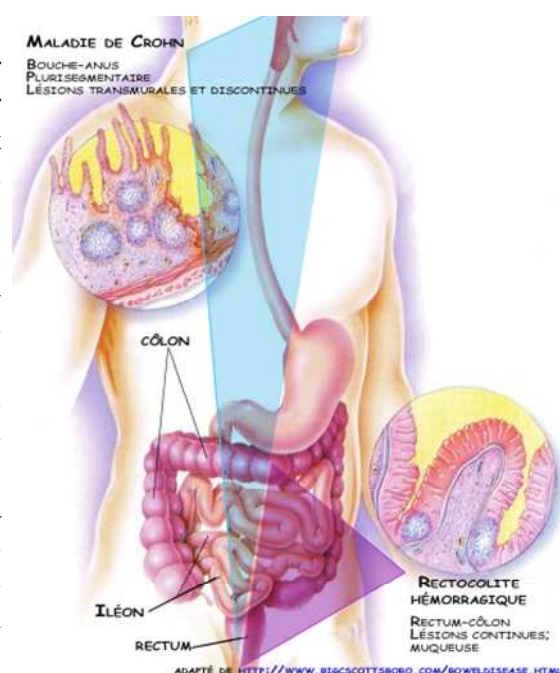


Figure 14 : organes touchés par les formes digestives de MC et RCH

II.3. Physiopathologie

II.3.1. Réponse immunitaire

Dans ces deux maladies, on observe une inflammation anormalement intense et prolongée témoignant d'un emballement de la réponse immunitaire. Cette réponse anormale aboutit à la sécrétion inappropriée de très grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α et l'interleukine-1 β (IL1 β). La cause de cette hyperactivation du système immunitaire reste inconnue. Une des hypothèses qui pourrait expliquer cette hyperactivation serait une réaction inappropriée à la flore intestinale (Podolsky, 2002). Diverses espèces bactériennes ont été incriminées, mais aucune ne semble pouvoir rendre compte de l'ensemble des cas. La défense immunitaire est défaillante à deux niveaux dans les MICI : d'une part la barrière muqueuse épithéliale est affaiblie, et d'autre part les réponses des immunités innée et acquise de l'hôte sont altérées.

II.3.1.1 Dérégulation de la réponse immunitaire innée (Matricon, 2010)

La perméabilisation de l'épithélium intestinal a pour conséquence l'augmentation des contacts entre les bactéries de la flore commensale et le système immunitaire muqueux. L'excès de telles interactions serait à l'origine d'une perte de tolérance à la flore commensale, ce qui activerait les cellules sentinelles de l'immunité innée : les cellules dendritiques de la muqueuse. Ces cellules sont à l'interface entre les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes T. Elles présentent les antigènes aux lymphocytes T auxiliaires dont elles favorisent la différenciation en lymphocytes T régulateurs. En cas d'infection, les cellules dendritiques activées par leurs récepteurs TLR (toll-like receptor) et NOD2 produisent des cytokines pro-inflammatoires et favorisent la différenciation en lymphocytes T effecteurs, ce qui amorce une inflammation locale persistante. Dans les MICI, une activation excessive des cellules dendritiques est observée au niveau des sites inflammatoires. Il en résulte une différenciation massive des lymphocytes effecteurs et une abolition des lymphocytes qui permettent la tolérance des bactéries commensales. Cette rupture de tolérance perpétue alors l'inflammation. La sur-activation des cellules dendritiques est très souvent la cause de mutations causant des dysfonctionnements des récepteurs TLR ou NOD2.

II.3.1.2. Dérégulation de la réponse immunitaire adaptative (Matricon, 2010)

Quand les MICI sont en phase active, il y a un déséquilibre entre le nombre de lymphocytes T effecteurs et de lymphocytes T régulateurs. Ces lymphocytes T effecteurs produisent des cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à entretenir l'inflammation. Elles vont entre autres provoquer un afflux anormal de cellules immunitaires au niveau de la muqueuse intestinale. Les MICI sont également caractérisées par une infiltration de lymphocytes B plasmatiques. La sur-activation de ces lymphocytes B entraîne une forte production d'auto-anticorps muqueux de type agressifs IgG dirigés contre les antigènes bactériens commensaux, tandis que la concentration d'IgA sécrétoires de type protecteur est diminuée, entretenant ainsi l'inflammation de la muqueuse.

II.3.2. Prédisposition génétique

Ces deux maladies bénéficient probablement d'une prédisposition génétique. Cependant, cette prédisposition semble moins nette pour la rectocolite hémorragique que pour la maladie de Crohn, même s'il existe également des antécédents familiaux pour cette affection, ainsi qu'une plus grande concordance de la maladie chez les jumeaux homozygotes que dizygotes (Binder and Orholm, 1996). Il s'agit de maladies plurigénétiques ; il existe donc certains loci

communs aux deux maladies, et d'autres spécifiques de l'une ou de l'autre. De nombreuses études tentent d'identifier les gènes qui causeraient ou favoriseraient les MICI. Parmi eux, les plus prometteurs sont les gènes qui codent pour des protéines permettant la reconnaissance et la présentation des antigènes bactériens (autophagie, complexe majeur d'histocompatibilité) et la coordination des réponses innée et adaptative du système immunitaire (Cho, 2008). Ainsi, outre le gène NOD2/CARD15, des gènes codants pour des interleukines (IL3, 4, 5, 10 ...) ou pour le TNF semblent impliqués.

II.3.3. Facteurs environnementaux

Enfin, les facteurs environnementaux influencent également ces pathologies : le tabac joue un rôle aggravant dans la maladie de Crohn, à l'inverse de la rectocolite hémorragique où il semble avoir une influence « bénéfique ». Les anti-inflammatoires non stéroïdiens favorisent la survenue des poussées et doivent donc être évités. Aucun facteur alimentaire spécifique n'a pu à ce jour être clairement associé à la survenue des MICI ou des poussées. Bien que toujours discuté, le stress semble être un facteur aggravant ou pouvant provoquer la survenue d'une poussée. Enfin, le rôle que pourrait jouer la flore intestinale dans l'apparition de ces maladies est étayé par le fait qu'une appendicectomie motivée par une infection protégerait les sujets adultes de la survenue d'une MICI.

II.4. Les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation intestinale

Lors des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, de nombreuses voies de signalisation impliquées dans les processus de l'inflammation sont dérégulées. Dans cette partie seront présentées les voies majeures participant à ce processus.

II.4.1. Voie TGF- β /Smad

Le TGF- β (transforming growth factor- β) est le ligand d'un récepteur sérine/thréonine kinase. Il a deux effets distincts : il joue un rôle dans la prolifération et la réparation des tissus (Faler et al., 2006), et d'autre part il stimule la production de la matrice extracellulaire, notamment des collagènes, des protéoglycanes et des glycoprotéines d'adhérence (Hocevar and Howe, 2000). Les souris présentant une invalidation de n'importe lequel des trois gènes du TGF- β meurent d'une inflammation de multiples organes due à la prolifération excessive des lymphocytes. Une expression inadaptée du TGF- β est fortement liée à la fibrose anormale des organes touchés par l'inflammation (pour revue, voir Pohlars et al., 2009). La surproduction de matrice extracellulaire est une caractéristique commune à de nombreuses maladies inflammatoires.

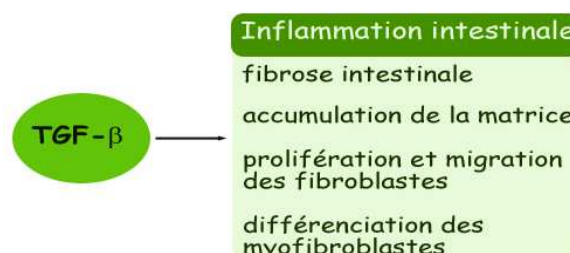


Figure 13 : action du TGF- β dans l'inflammation intestinale (adapté de Pohlars et al., 2009).

L'activation du récepteur du TGF- β conduit à une coopération de ses sous-unités qui vont activer des facteurs de transcription cytoplasmiques : les Smad. Il existe 3 classes de Smad : les Smad régulées (R-Smad) tels que Smad 2 et Smad3, le co-Smad Smad4 et enfin les Smad

inhibiteurs (comme Smad7). Le récepteur activé va phosphoryler les R-Smad qui vont former un hétérodimère actif avec le co-Smad qui va alors se transloquer dans le noyau. La fonction des Smads est principalement de réguler les gènes de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Dans l'intestin, le TGF- β est exprimé de façon constitutive par les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules mononucléées (Babyatsky et al., 1996). Son rôle critique dans l'homéostasie intestinale comme régulateur de l'inflammation a été bien établi. Des études sur des souris invalidées pour Smad3 montrent que ce facteur tient un rôle essentiel en tant que médiateur de la réponse anti-inflammatoire médiée par le TGF- β (Yang et al., 1999). Les patients atteints de maladie de Crohn montrent une diminution de phospho-Smad3 dans la muqueuse (bien qu'ayant une expression abondante du TGF- β), comparé aux contrôles ainsi qu'une diminution du complexe formé avec Smad4. Ceci peut être dû à l'induction et à la surexpression de Smad7 dans la muqueuse de ces patients (Monteleone et al., 2004). Ce même groupe a démontré qu'il existe des interactions entre la voie de signalisation Smad et l'activation du NF- κ B dans l'intestin inflammatoire : alors que le TGF- β 1 est un inhibiteur potentiel du TNF- α induit par l'activation de NF- κ B dans l'intestin normal, il n'a aucune activité dans l'intestin inflammatoire, ce qui peut être attribué à une surexpression de Smad7 ; en effet, un traitement des cellules provenant d'un intestin inflammatoire avec un siRNA Smad7 permet au TGF- β 1 de réduire rapidement l'activation du NF- κ B (Monteleone et al., 2004).

II.4.2. Voie NF-kappaB

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle pivot dans la réponse cellulaire d'un grand nombre de situations de stress, comme par exemple lors de l'exposition à des produits microbiens ou à des cytokines pro-inflammatoires. Ce facteur, qui joue également un rôle pro-inflammatoire, tient également une grande place dans l'homéostasie visant à maintenir l'intégrité du tissu pendant l'inflammation.

La famille des facteurs de transcription NF- κ B est composée de 5 membres. Ces protéines forment des homo- ou des hétéro-dimères qui peuvent influencer le niveau d'expression de gènes possédant des sites κ B dans leur région promotrice. Les dimères NF- κ B sont normalement retenus dans le cytoplasme par des membres de la famille des protéines inhibitrices de κ B (I κ B). Les signaux de stress vont induire la dégradation des protéines I κ B, qui vont alors relarguer le NF- κ B et permettre sa translocation dans le noyau (Hayden and Ghosh, 2008). L'activation de la voie NF- κ B consiste en l'activation du complexe IKK (pour I kappa B Kinase), composé des deux sous-unités catalytiques IKK1 et 2 et d'une sous-unité régulatrice NEMO. Une fois activé, ce complexe va phosphoryler les protéines I κ B qui seront alors ubiquitinylées et dégradées par le protéasome.

Les cellules possèdent deux types de récepteurs capables de reconnaître les éléments bactériens de la microflore intestinale ; il s'agit des « Toll-like » récepteurs et des « NOD-like » récepteurs. Ces deux types de récepteurs initient la voie de signalisation qui conduit à l'activation du NF- κ B et donc à une réponse inflammatoire. Les TLR sont portés par les cellules immunitaires, mais certains sont également portés par la membrane apicale des cellules intestinales épithéliales comme c'est le cas pour le TLR4 et le TLR2 (Otte et al., 2004). Des souris invalidées pour le TLR4 ont montré une sensibilité accrue aux colites induites par le DSS (Fukata et al., 2005), ce qui montre également le rôle de la voie de signalisation NF- κ B dans le maintien de l'intégrité tissulaire durant l'inflammation.

II.4.3. La voie JAK/STAT, les interleukines et le TNF α : des cytokines impliquées dans l'inflammation

Les cytokines sont une famille variée d'hormones polypeptidiques et de facteurs de croissance qui régulent de nombreux processus cellulaires. Elles sont principalement produites par les cellules immunitaires et facilitent la communication inter-cellulaire. Ainsi, les interleukines modulent les cellules du système immunitaire et les mutations de leurs récepteurs provoquent une immunodéficiência. Les récepteurs des interleukines possèdent deux domaines fibronectine III extracellulaires qui lient le ligand. Les domaines cytoplasmiques sont dépourvus d'activité enzymatique, mais lient une tyrosine kinase appelée JAK (just another kinase ou Janus kinase). JAK va s'activer par transphosphorylation réciproque, et va ainsi pouvoir phosphoryler des facteurs de transcription STAT (signal transducers and activators of transcription), qui vont migrer vers le noyau pour y réguler l'expression des gènes. Parmi ces facteurs STAT, STAT3 régule des gènes impliqués dans l'apoptose, la prolifération et la migration. Il joue un rôle important dans de nombreuses maladies liées au système immunitaire comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, et permet de réguler la réparation de la muqueuse dans les colites (Pickert et al., 2009). De nombreuses études ont décrit une activation de STAT3 dans les MICI au niveau des macrophages et des lymphocytes T, mais pas des neutrophiles (Sugimoto, 2008).

Lors d'une inflammation dans l'intestin, les cellules dendritiques activées et les macrophages sécrètent des cytokines qui vont activement réguler la réponse inflammatoire. Elles vont ainsi provoquer la différenciation de nombreuses cellules T (qui reconnaissent les antigènes de cellules étrangères : bactéries, cellules cancéreuses) afin d'induire une réponse immunitaire adaptée. Dans les MICI, on observe une dérégulation de ces cellules T qui seront alors surproduites, entraînant une réponse immunitaire disproportionnée. De la même façon, de nombreuses cytokines seront dérégulées.

Il existe des cytokines ayant un rôle pro-inflammatoire, et des cytokines ayant un rôle anti-inflammatoire. Ainsi, dans les MICI, les cytokines à effet pro-inflammatoire comme le TNF- α , les interleukines IL-6 et IL1- β sont classiquement augmentées. Les souris invalidées pour l'IL-10 (cytokine à effet anti-inflammatoire) sont un modèle génétique classique d'étude des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Kuhn et al., 1993).

II.5. Cancers associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Depuis la dernière décennie, une connexion entre l'inflammation et la tumorigenèse a été bien établie grâce à des preuves issues de la génétique ou d'études épidémiologiques (pour revue, voir Terzic et al., 2010). Les patients atteints de MICI présentent un risque accru de développer un cancer colorectal. Les mécanismes moléculaires selon lesquels l'inflammation favoriserait le développement du cancer sont encore mal connus.

Le cancer colorectal est la 4^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde (Tenesa and Dunlop, 2009). Seulement 20% de ces cancers colorectaux ont une origine familiale (Rustgi, 2007), les autres étant reliés à des facteurs environnementaux qui provoquent des mutations. Parmi les gènes impliqués, le gène APC est celui qui est le plus fréquemment muté. Ces risques incluent des mutagènes transmis par les aliments, des pathogènes intestinaux et l'inflammation chronique, qui précède le développement de tumeurs. Les cancers associés aux colites (ou CAC pour « colitis-associated cancer ») sont le sous-type de cancers colorectaux qui découlent des MICI. Ils sont difficiles à traiter, et ont un fort taux de mortalité (Feagins et al., 2009). Plus de 20% des patients atteints de MICI développent un cancer dans l'intervalle

de 30 ans de maladie, et plus de 50% de ces patients vont en mourir (Lakatos and Lakatos, 2008). Il existe des similitudes entre les cancers colorectaux et les CAC. Par exemple, les voies de signalisation impliquées dans les cancers colorectaux comme la voie Wnt/ β -caténine, la voie K-Ras ou la voie p53 sont également altérées dans les CAC. Par contre le moment d'altération de ces voies diffère : c'est en effet le gène p53 qui le premier gène muté dans les CAC (**Figure 15**) (Itzkowitz and Harpaz, 2004).

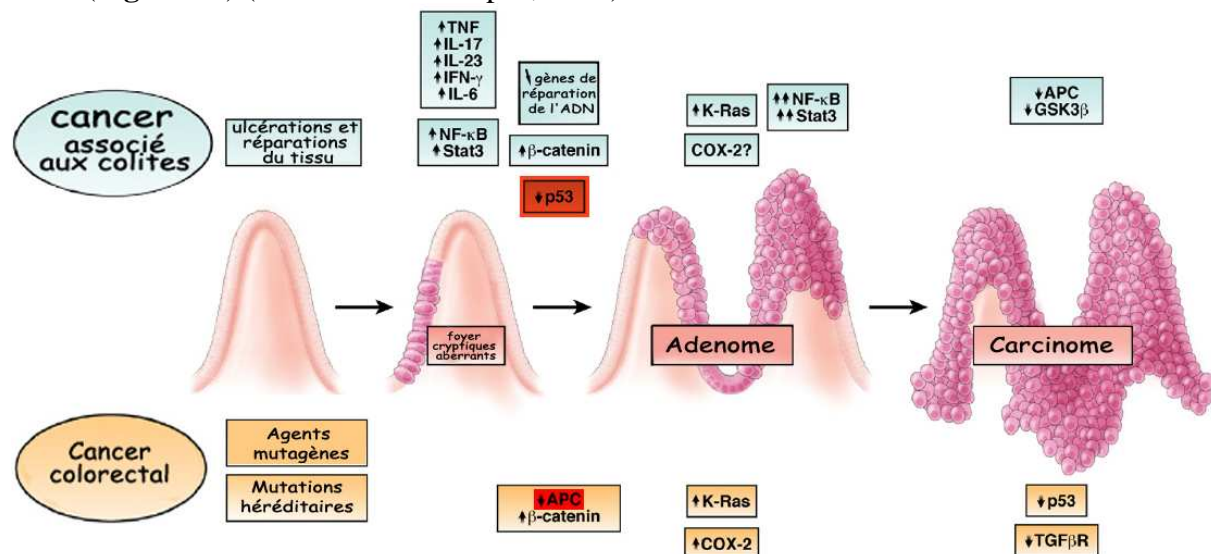


Figure 15 : résumé des altérations génétiques et environnementales qui contribuent au développement du cancer associé aux MICI et du cancer colorectal. La perte de fonction d'APC est un évènement précoce dans les cancers colorectaux sporadiques, tandis que dans les cancers associés aux colites, c'est l'altération de p53 qui est l'évènement précoce. (Adapté de Terzic et al., 2010)

Les patients atteints de MICI et qui ont des antécédents familiaux de cancer colorectal présentent un risque 2 fois plus élevé de développer un cancer, ce qui suggère un recouvrement des mécanismes qui gouvernent le développement d'un cancer colorectal ou d'un CAC (Askling et al., 2001).

II.5. Modèles animaux d'étude des colites

De nombreux modèles animaux d'inflammation intestinale ont été développés. Leur nombre et la diversité des mécanismes à l'origine d'une inflammation intestinale illustre la complexité à modéliser de telles maladies. Dans la plupart des modèles d'inflammation murins, l'inflammation se limite au côlon et ne touche l'intestin grêle que plus rarement. Il existe trois types de modèles : les modèles spontanés, l'inflammation induite à l'aide de produits chimiques et l'inflammation reproduite grâce à des souris génétiquement modifiées (surexpression ou invalidation d'un gène impliqué dans l'inflammation).

II.5.1. Modèles spontanés

Certains fonds génétiques de souris développent spontanément des colites. C'est le cas par exemple des souris C3H/HeJ/Bir, qui développent une inflammation dans la partie droite du côlon à partir de la 3^{ème} semaine de vie et qui disparaît vers la 10^{ème} semaine (Sundberg et al., 1994). Ces souris développent des ulcères et des abcès cryptiques ; par contre il n'y a pas d'épaississement des parois de l'intestin. Les souris SAMP1/Yit développent quant à elles des iléites (Matsumoto et al., 1998).

II.5.2. Modèles induits chimiquement

Ces modèles sont les plus couramment utilisés pour étudier l'inflammation intestinale chez la souris. Les inducteurs les plus classiques sont le TNBS (2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid), l'oxazolone et le dextran sulfate de sodium (DSS). Ces modèles sont utiles pour étudier les voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans l'inflammation, ou pour tester l'effet favorisant ou au contraire protecteur contre l'inflammation d'une protéine, en traitant des souris invalidées ou surexprimées pour le gène d'intérêt.

II.5.2.1. Induction par un haptène

Ce sont des molécules de faible poids moléculaire non immunogènes par elles-mêmes, comme le TNBS ou l'oxazolone. L'administration d'une dose non toxique d'haptène dans le côlon entraîne la formation d'un complexe entre l'haptène et certains acides aminés contenus dans les protéines du contenu et des parois coliques. Ce complexe est à l'origine d'une réponse immunitaire ; on peut donc parler de modèle d'inflammation « immunologique ». Les colites causées par l'oxazolone miment la rectocolite hémorragique humaine, avec une inflammation du côlon plus distal que par induction par le TNBS (Boirivant et al., 1998).

II.5.2.2. Induction par le DSS

L'administration orale dans l'eau de boisson de DSS va léser la paroi intestinale. La colite apparaît rapidement après administration (environ 2 jours) et conduit à des lésions souvent sévères par altération de la barrière intestinale qui met en contact la flore et l'immunité intestinale sous-jacente. Le recrutement de cellules inflammatoires concourt à entretenir l'inflammation et les lésions. Les symptômes observés chez les souris sont une perte de poids, du sang dans les selles, un raccourcissement de l'intestin, des ulcères muqueux et des infiltrats de neutrophiles. Il existe de nombreux protocoles qui impliquent des concentrations et des temps de traitement différents (Wirtz et al., 2007).

II.5.3. Modèles génétiques

II.5.3.1. Modèles de knock-out

Ces modèles consistent à invalider chez la souris des gènes ayant un rôle actif dans les MICI. Parmi ceux-ci, le modèle de souris KO pour l'interleukine-10 (IL-10) est sans doute le plus classique. L'IL-10 est produite par les cellules T, les cellules B, les macrophages, les cellules du thymus et les kératinocytes. Cette cytokine a des effets anti-inflammatoires. Les souris IL-10^{-/-} développent une inflammation spontanée dans tout le tractus intestinal (Kuhn et al., 1993). Comme nous l'avons vu précédemment, les souris invalidées pour le gène MUC2 développent également des colites spontanées (Van der Sluis et al., 2006). Elles présentent en effet un épaississement de la muqueuse, une augmentation de la prolifération et des érosions superficielles. Le phénotype observé est aggravé si les souris sont en plus traitées par un inducteur chimique.

II.5.3.2. Modèles transgéniques de surexpression

Des modèles de souris surexprimant des molécules inflammatoires développent également des colites. C'est le cas par exemple des souris transgéniques surexprimant l'interleukine-7 (IL-7) ou l'interleukine-18 (IL-18) (Ishikura et al., 2003) qui développent des colites plus sévères sous induction chimique.

II.5.4. Modèles de cancer associé aux colites

Ce modèle est obtenu par traitement des souris à l'azoxyméthane (AOM) qui est un carcinogène chimique, puis par un traitement chronique au DSS, alternant les semaines de traitement par le DSS avec des semaines de « réparation » avec de l'eau normale. L'AOM permet de générer des mutations au niveau de l'ADN, en alkylant l'ADN ce qui facilite les mésappariements (Papanikolaou et al., 1998) de bases. Ces mutations seront les événements précoces de la cancérogenèse, amplifiés et entretenus par une inflammation chronique induite par la répétition des cycles d'administration du DSS (Neufert et al., 2007).

III. Éléments de la matrice extracellulaire

III.1. La lame basale, spécialisation de la matrice extracellulaire

Le tissu conjonctif se compose de cellules et d'un ensemble de macromolécules extracellulaires qui forment la matrice. Cette matrice extracellulaire comporte diverses classes de macromolécules ; on trouve principalement : les collagènes, les protéoglycanes, les glycoprotéines adhérentes, les ténaescines et l'élastine, qui permettent de conférer à la matrice des formes et des propriétés mécaniques très variées. Il existe pour ces molécules différentes isoformes ayant des configurations spatiales variables. La matrice extracellulaire peut donc être adaptée à chaque tissu concernant ses exigences fonctionnelles spécifiques comme par exemple l'élasticité de la peau et des vaisseaux (nombreuses fibres d'élastine), ou la force de traction des tendons (collagènes).

La lame basale est une spécialisation de la matrice extracellulaire. C'est un feuillet composé d'un réseau de laminine et d'un réseau de collagène IV interconnectés entre eux par des molécules de nidogène et de perlecan. Elle souligne les épithéliums, les endothéliums et la plupart des cellules musculaires, adipeuses et nerveuses et assure ainsi un rôle de soutien, ainsi qu'un rôle plus actif dans les processus de morphogenèse, de prolifération et de différenciation.

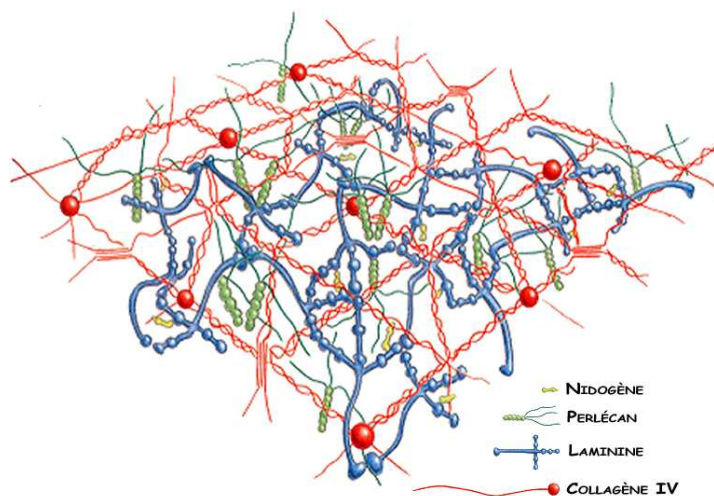


Figure 16 : structure tridimensionnelle de la lame basale (adapté de « Molecular Biology of the Cell, 4th Edition »)

III.2. Les principaux composants de la lame basale (Yurchenco and Patton, 2009)

Les molécules qui composent la lame basale sont sécrétées par les cellules environnantes. On distingue deux couches en microscopie électronique à transmission : la *lamina densa*, plus sombre, qui va conférer à la lame basale une certaine stabilité mécanique, et la *lamina lucida*, couche claire proche du pôle basal des cellules. Les deux réseaux de laminines et de collagènes IV vont se former de façon indépendante, puis seront interconnectés.

Le **collagène de type IV** est formé de 3 chaînes α polypeptidiques qui s'enroulent en hélice. En tout, il existe 6 chaînes α différentes de collagène IV chez l'humain ; l'isoforme $\alpha1_2\alpha2$ [IV] étant l'isoforme majoritaire des lames basales. Ce réseau de collagène IV est indispensable à l'intégrité de la lame basale, comme le montre la létalité embryonnaire de souris invalidées pour les gènes codant pour les chaînes $\alpha1$ et $\alpha2$ du collagène de type IV ; par contre il n'est pas nécessaire à l'initiation de l'assemblage de la lame basale (Pöschl et al., 2004).

Le **nidogène** (que l'on peut également trouver dans la littérature sous le nom d'entactine) est une glycoprotéine sulfatée contenant 3 domaines globulaires qui permettent la liaison aux laminines et au collagène IV et apporte ainsi une certaine stabilité à la lame basale, importante lors de l'exposition à des stress mécaniques (par exemple dans le muscle squelettique). Il existe 2 membres de la famille du nidogène, le nidogène-1 et le nidogène-2, qui semblent pouvoir se compenser l'un l'autre. Cependant, si l'ablation conjointe des deux types de nidogène n'empêche pas d'établir l'architecture des tissus durant l'organogenèse, elle engendre une létalité post-natale chez la souris, due à des défauts de la lame basale dans le poumon et le tissu cardiaque (Bader et al., 2005).

Le **perlecan** est un protéoglycane qui porte 3 chaînes d'héparane sulfate. Il lie le nidogène via sa partie protéique, et le collagène IV et les laminines par ses chaînes de glycosaminoglycanes. 40% des souris invalidées pour le gène *Hspg2* meurent à E10.5 d'un défaut de développement cérébral, tandis que 60% de ces souris meurent juste après la naissance avec des défauts craniofaciaux et/ou des dysplasies du squelette (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Costell et al., 1999).

Enfin, les **laminines**, sur lesquelles s'est focalisé mon travail de thèse, sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées de l'association spécifique de chaînes α , β et γ afin de former 15 isoformes. Ces isoformes sont exprimées de façon spécifique suivant le temps et le tissu. Elles participent aux voies de signalisation en se liant à des récepteurs comme les intégrines, pour agir sur la prolifération ou la différenciation des cellules. Elles seront décrites plus en détail ci-après.

III.3. Les laminines

III.3.1. Structure (Tunggal et al., 2000)

Les laminines (LM) sont des molécules de haut poids moléculaire. Les 3 chaînes qui les composent sont codées par des gènes distincts, et s'associent en une structure ayant le plus généralement une forme de croix avec 3 bras courts qui portent les parties NH_2 -terminales et un bras long formé par l'association en triple hélice des parties COOH -terminales. Le nom de chaque isoforme de laminine est défini par sa composition en chaînes (Aumailley et al., 2005) (**Figure 17**) ; par exemple, l'association des chaînes $\alpha5$, $\beta1$ et $\gamma1$ forme la laminine-511 (LM-511).

Plusieurs domaines ont été décrits sur les laminines : premièrement le **domaine G**, qui est composé par la partie COOH -terminale des chaînes α , et se subdivise en 5 sous-domaines LG1 à LG5. Ce domaine G permet la liaison aux récepteurs des laminines comme les intégrines, l' α -dystroglycan ou le Luthéran pour la chaîne $\alpha5$, récepteurs qui seront développés plus loin. On trouve ensuite les **domaines I et II** qui correspondent à la région de connexion en hélice des 3 chaînes composant l'isoforme. Près du centre de la croix, des ponts

disulfures stabilisent la molécule. Pour l'heure, seul le rôle structural de ces domaines est connu. Les **domaines III et V** se situent sur les bras courts des laminines et sont composés d'une série allant de 3 à 8 modules EGF-like (LE), qui diffèrent des modules EGF classiques par l'ajout de 2 résidus cystéines supplémentaires. Le 4^{ème} module LE du domaine III de la chaîne $\gamma 1$ de laminine est directement impliqué dans la liaison au nidogène (**Figure 17**). Le **domaine IV** est un domaine globulaire. Il est également situé sur le bras court des chaînes de laminine, mais la chaîne α en possède 2 appelés IVa et IVb. La fonction de ce domaine n'a pas encore pu être totalement établie ; une mutation de ce domaine dans la chaîne $\alpha 2$ humaine a été observée dans des formes modérées de dystrophie musculaire (Allamand et al., 1997). Enfin, le **domaine VI** représente le domaine globulaire terminal du bras court des chaînes de laminine. C'est la partie la plus conservée de la molécule et elle joue un rôle dans l'assemblage des laminines en lame basale. Elle comporte également, pour la chaîne α , un domaine de liaison aux intégrines.

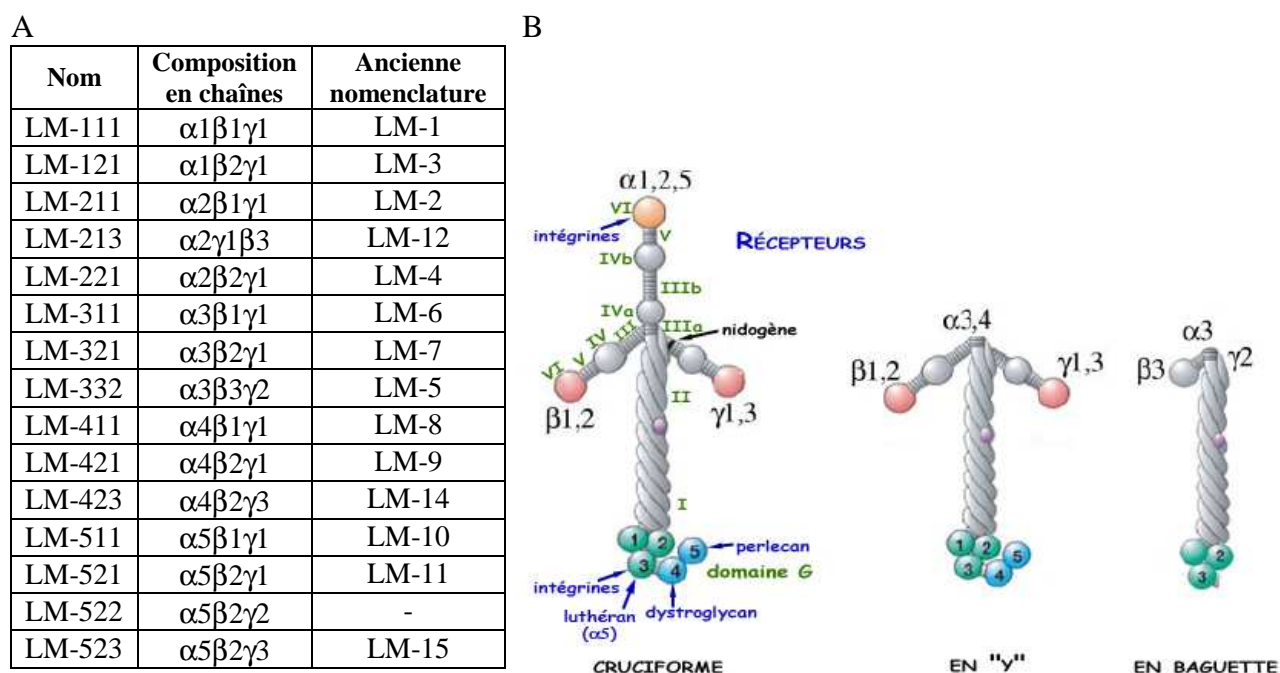


Figure 17: (A) présentation des 15 isoformes de laminines (LM), ainsi que (B) des différentes formes que peuvent adopter les laminines (adapté de Miner, 2008). La forme cruciforme est la plus représentative et permet la polymérisation en réseau. La forme en Y ne polymérise pas, tandis que la forme en baguette est clivée par protéolyse pour être spécialisé (ex : contribution à la formation des hémidesmosomes). Sont également représentés les différents domaines qui composent les chaînes de laminine et les principaux sites de liaison soit aux récepteurs soit aux autres composants de la lame basale. Les différents domaines des LM sont notés en vert.

III.3.2. Origine cellulaire des laminines et des molécules de la lame basale dans l'intestin

Les mécanismes utilisés par les cellules pour déposer la matrice extracellulaire ne sont pas encore totalement compris. Plus de 10 gènes différents de laminine contribuent à l'assemblage de la lame basale ; ils sont dépendants du stade et du tissu. La lame basale intestinale sous-épithéliale est assemblée à partir de composants dérivés à la fois du tissu épithélial et du tissu mésenchymateux. Pour déterminer l'origine cellulaire de la lame basale, une stratégie d'intestin « hybride », c'est-à-dire d'association inter-espèces faisant appel aux interactions épithélio-mésenchymateuses a été utilisée. Par la suite, l'utilisation d'anticorps spécifiques des espèces a permis de démontrer que le dépôt de la lame basale résultait d'une collaboration entre les deux compartiments (Simon-Assmann et al., 2009). Quel que soit le stade, les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ de laminines, qui sont les chaînes les plus ubiquitaires, ont une

origine double, à la fois épithéliale et mésenchymateuse, tandis que le perlecan et le nidogène ont une origine strictement épithéliale ou mésenchymateuse, respectivement. Chaque chaîne de laminine a son origine particulière, qui peut varier suivant le stade (différents stades embryonnaires/adulte). Par exemple, lors des stades précoces du développement et de la mise en place de la lame basale intestinale, les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminine ainsi que le collagène IV sont dérivés de l'endoderme. Dans des stades plus tardifs, ces molécules sont également déposées par le mésenchyme (Figure 18).

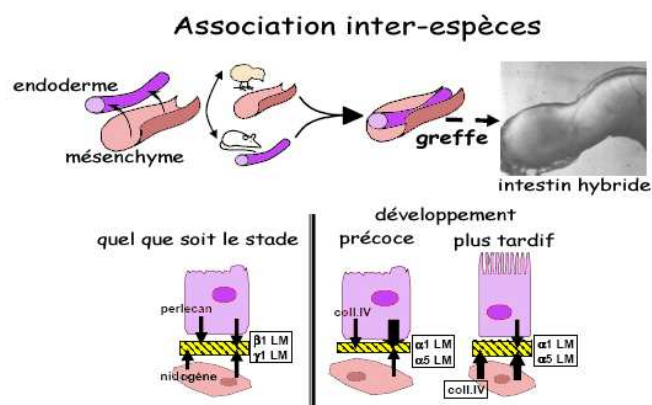


Figure 18 : origine cellulaire des molécules de la lame basale par la technique d'association inter-espèces (adapté de Simon-Assmann et al., 2010a)

III.3.3 Implication des laminines en pathologie

L'expression des laminines est spécifique du tissu mais également du stade de vie. Cette spécificité sous-entend un rôle particulier de chaque chaîne, qui a en partie pu être mis en évidence par l'étude de souris invalidées pour la chaîne d'intérêt. Dans la majorité des cas, la délétion d'une chaîne de laminine entraîne une létalité chez la souris, comme décrit dans le **tableau 3**.

Sous-unité de laminine	Distribution tissulaire	Phénotype souris KO	Pathologie humaine associée
$\alpha 1$	embryon, membrane de Reichert, placenta, rein, glandes mammaires, ovaires, utérus, testicules, rétine, intestin, foie, poumons	létalité embryonnaire précoce	non décrite
$\alpha 2$	trophoblaste, muscles squelettique et cardiaque, nerfs périphériques, intestin, cerveau	létalité à 5 semaines de vie post-natale, dystrophies musculaires	dystrophie musculaire congénitale
$\alpha 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité post-natale. Décollement de l'épiderme	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\alpha 4$	muscles squelettiques, muscles lisses, endothélium, moelle osseuse	altérations des jonctions neuromusculaires : mouvements non coordonnés	non décrite
$\alpha 5$	reins, poumons, vaisseaux sanguins, moelle osseuse, muscles et nerfs, la plupart des LB sous-épithéliales (intestin, poumon...)	létalité embryonnaire vers E16.5. Défauts de placentation, défauts développementaux des poumons, des reins et de l'intestin. Syndactylie et excécéphalie.	non décrite
$\beta 1$	ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	non décrite
$\beta 2$	glomérules rénaux, vaisseaux sanguins	létalité post-natale. Défauts d'ultrafiltration rénale et anomalie au niveau des jonctions neuromusculaires, dysplasie rétinienne	syndrome de Pierson
$\beta 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	/	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 1$	ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	non décrite
$\gamma 2$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité à 5 jours de vie post-natale. Décollement de l'épiderme.	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 3$	reins, poumons, appareil génital, nerfs, cerveau, rétine	dysplasie rétinienne	non décrite

Tableau 3 : récapitulatif de la distribution tissulaire des chaînes de laminine, ainsi que du phénotype des souris invalidées pour la chaîne d'intérêt et l'implication éventuelle de cette chaîne dans une pathologie humaine. (Adapté de Rozario and DeSimone, 2010; Yurchenco and Patton, 2009). LB = lame basale.

Certaines délétions reproduisent parfaitement chez la souris des pathologies humaines, comme c'est le cas par exemple pour l'épidermolyse bulleuse. On peut ainsi voir que chez la souris, une invalidation soit de la chaîne $\alpha 3$ soit de la chaîne $\gamma 2$ entraîne un décollement de l'épiderme du derme sous-jacent (Meng et al., 2003; Ryan et al., 1999)

III.3.4. Généralités sur les laminines présentes au niveau de l'intestin

Dans l'intestin, les lames basales sont présentes sous l'épithélium qu'elles séparent du tissu conjonctif et elles entourent les cellules musculaires lisses. Chez l'homme et la souris, 5 chaînes α , 3 chaînes β et 2 chaînes γ sont exprimées dans l'intestin (Simon-Assmann et al., 1998; Teller and Beaulieu, 2001).

La composition en laminines de la lame basale sous-épithéliale intestinale est spécifique selon le temps (développement/adulte), la région de l'intestin (duodénum/côlon) et la localisation crypte/villosité. Par des expériences de co-marquage, on peut co-localiser les chaînes de laminine présentes dans l'intestin et émettre des hypothèses sur les isoformes majoritairement représentées dans l'intestin ; ce sont : la laminine-111 (composée des chaînes $\alpha 1\beta 1\gamma 1$), qui est fortement exprimée lors du développement et se restreint aux cryptes de l'intestin grêle au stade adulte ; les laminine-211 et -221, qui se localisent au niveau des cryptes, et les laminines -332 et -511, présentes dès les stades embryonnaires, et qui sont exprimées selon un gradient croisant le long de l'axe crypto-villositaire.

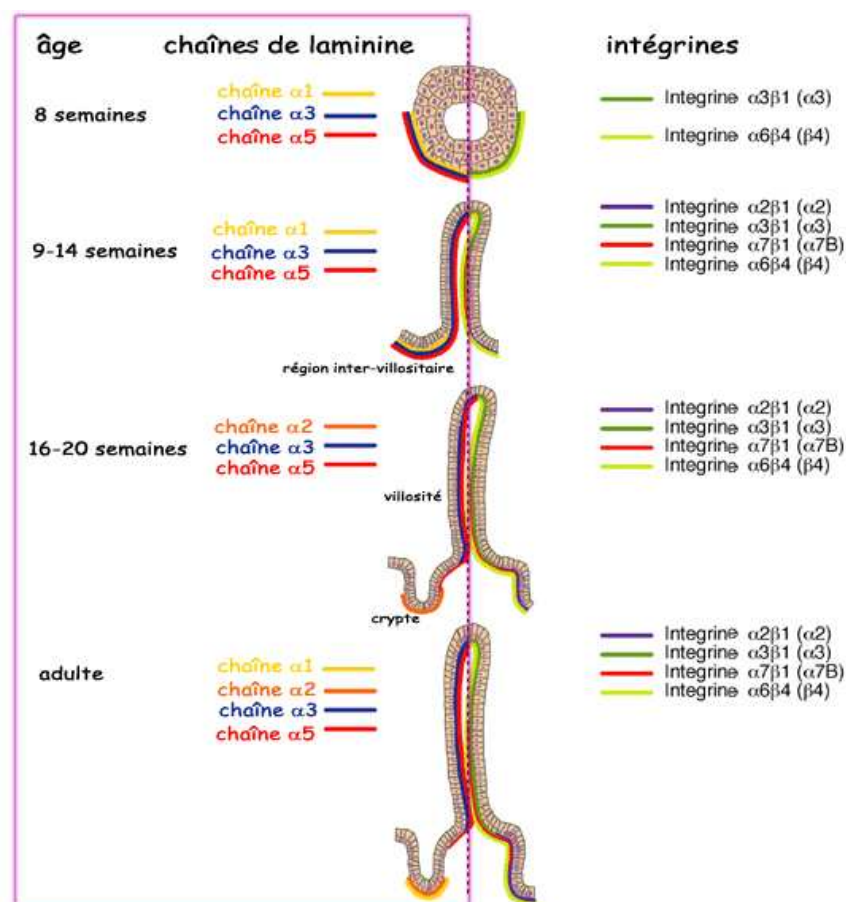


Figure 19 : localisation des chaînes α de laminine (cadre) dans la lame basale sous-épithéliale et de leurs récepteurs intégrines le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin grêle, en fonction du stade de développement chez l'humain. (Adapté de Teller and Beaulieu, 2001). Les chaînes $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ sont prépondérantes lors des étapes précoces du développement, la chaîne $\alpha 2$ n'apparaît que plus tardivement en même temps que les cryptes, région d'expression où elle est restreinte. La chaîne $\alpha 1$ va disparaître progressivement au cours du développement, pour se restreindre à la région des cryptes de l'intestin grêle chez

l'adulte (Virtanen et al., 2000 et U682, données de l'équipe). Les intégrines présentées sur ce schéma seront décrites dans le paragraphe III.6.1.

Les 5 chaînes α sont exprimées dans l'intestin, soit au niveau de la lame basale sous-épithéliale, soit au niveau des lames basales entourant les cellules musculaires. Les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 1$ seront présentées plus en détail dans les parties qui leur seront consacrées ci-après.

III.3.4.1. La chaîne $\alpha 2$ de laminine

Des expériences d'association inter-espèces ont pu montrer que la chaîne $\alpha 2$ était produite par le mésenchyme (Lefebvre et al., 1999). En plus de sa localisation dans la lame basale sous-épithéliale au niveau de la région des cryptes, on retrouve également cette chaîne dans la *lamina propria*, probablement pour délimiter les cellules musculaires lisses. Comme cette chaîne apparaît en même temps que les cryptes intestinales, on pourrait envisager un rôle de la chaîne $\alpha 2$ dans la genèse des cryptes, ou un rôle dans la prolifération des cellules souches ou la différenciation des cellules de Paneth. Cependant, les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 2$ ne montrent aucune perturbation de la formation des cryptes intestinales, et il n'y a pas d'anomalies de la morphogenèse de ces cryptes ou de la cytodifférenciation des cellules de Paneth (Simon-Assmann et al., 1994). Elle s'associe probablement avec les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$, ubiquitaires, pour former l'isoforme laminine-211 ainsi qu'avec la chaîne $\beta 2$, présente dans les cryptes, pour former l'isoforme laminine-221.

III.3.4.2. La chaîne $\alpha 3$ de laminine

Le patron d'expression de la chaîne $\alpha 3$ de laminine est similaire à celui de la chaîne $\alpha 5$ au niveau de la lame basale sous-épithéliale ; par contre, on ne la retrouve pas au niveau musculaire. Elle peut s'associer avec les chaînes $\beta 3$ et $\gamma 2$ pour former l'isoforme laminine-332. En plus de développer des épidermolyses bulleuses et de mourir quelques jours après la naissance, les souris invalidées pour le gène *lama3* (codant pour la chaîne $\alpha 3$ de laminine) présentent des défauts gastro-intestinaux : une réduction de la taille de l'estomac a en effet été observée, et par voie de conséquence du contenu de celui-ci en lait (Ryan et al., 1999).

III.3.4.3. La chaîne $\alpha 4$ de laminine

La localisation de la chaîne $\alpha 4$ se situe au niveau du tissu mésenchymateux intestinal pendant le développement. Chez l'adulte, on la retrouve au niveau de la *lamina propria* et autour des cellules musculaires lisses. Son origine est exclusivement mésenchymateuse (Lefebvre et al., 1999). Les souris invalidées pour le gène *lama4* présentent de fortes hémorragies pendant le développement (Thyboll et al., 2002), mais aucun phénotype intestinal n'a été décrit jusqu'à présent, malgré la prédominance de cette chaîne dans les muscles lisses intestinaux, peut être du à des phénomènes de compensation par les autres chaînes de laminine.

III.4. La laminine-511

La laminine-511 se compose des chaînes $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\gamma 1$. Les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ étant ubiquitaires et pouvant s'associer avec d'autres chaînes α , c'est la chaîne $\alpha 5$ qui caractérise cet isoforme. La chaîne $\alpha 5$ est la chaîne de laminine la plus représentée dans l'organisme. Elle joue un rôle important à la fois lors du développement embryonnaire, et reste largement exprimée dans les tissus adultes (Miner, 2008). Elle peut également se combiner avec les chaînes $\beta 2$ et $\gamma 2$ pour former au total 4 isoformes : laminine-511, laminine-521, laminine-522 et laminine-523.

III.4.1. Le gène *lama5*

Chez l'homme, la chaîne $\alpha 5$ est codée par le gène *LAMA5*, qui a été localisé par hybridation in situ sur le chromosome 20q13.2-q13.3 ; chez la souris, il est codé par le gène *lama5*, qui a été localisé par analyse croisée sur le chromosome 2 (Durkin et al., 1997). Des analyses de séquences ont montré qu'il y a une assez bonne homologie avec laminine A de drosophile, suggérant que le gène ancestral de la chaîne α possède plus de similitudes avec le gène *lama5* qu'avec les gènes codant pour les chaînes $\alpha 1$ à $\alpha 4$ (Miner et al., 1995). Des études de promoteur de ce gène n'ont pas encore été publiées à ce jour.

III.4.2. Expression de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

La chaîne $\alpha 5$ de laminine est exprimée chez la souris dès le stade embryonnaire E4,5 au stade blastocyste, au niveau de la lame basale du trophoblaste et autour des cellules de la masse cellulaire interne. Après implantation, elle est exprimée dans la lame basale embryonnaire qui se situe entre l'ectoderme et l'endoderme viscéral (Miner et al., 2004). Par la suite, après la gastrulation, elle est localisée dans les lames basales neurectodermique, ectodermique et endodermique. Après fermeture du tube neural, son expression se restreint aux lames basales situées sous l'ectoderme et sous l'endoderme (Miner et al., 1998). La chaîne $\alpha 5$ de laminine est très vastement exprimée à la fois dans le tissu embryonnaire et dans le tissu adulte ; elle est représentée dans les lames basales associées aux cellules épithéliales, aux cellules musculaires et aux cellules nerveuses, et à divers organes dont l'intestin (lame basale sous-épithéliale, *muscularis mucosae*, couches musculaires lisses).

III.4.3. Rôles de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

III.4.3.1. Étude des souris invalidées pour le gène *lama5*

Des souris knock-out pour le gène *lama5* ont été réalisées par remplacement de 113 acides aminés situés dans les exons 4 et 5 par une cassette LacZ/néo (Miner et al., 1998). Cette invalidation engendre une létalité embryonnaire vers 16,5 jours de développement probablement due à des défauts sévères de placentation et à une exencéphalie (absence de fermeture du tube neural). D'autres défauts sont observés chez ces embryons (voir **figure 20**) : une syndactylie (absence de séparation digitale) qui touche un à plusieurs membres selon la gravité du phénotype, des yeux absents ou très atrophiés, des défauts de morphogénèse des poumons, des reins et du cœur (qui présente un ventricule gauche de taille réduite). Les embryons mutants peuvent présenter à stade égal des phénotypes plus ou moins sévères (Miner et al., 1998).



Figure 20 : phénotype des embryons invalidés pour *lama5* au stade E15,5. Têtes de flèche : exencéphalie ; flèches : syndactylie (photos thèse Léa Ritié-Pertusa, 2008)

Exencéphalie : dans environ 60% des mutants examinés, Miner et ses collègues ont observé que le cerveau était élargi et déformé, et qu'il n'était pas couvert par de la peau ou de l'os crânien. Ce phénotype est dû à une absence de fermeture du tube neural antérieur. Cette absence de fermeture pourrait être due à la discontinuité et à la finesse de la lame basale ectodermique qui borde le neurectoderme, et qui semblerait être impliquée dans la génération des forces permettant la fermeture du tube neural (Miner et al., 1998).

Syndactylie : les embryons *lama5^{-/-}* ne présentent pas de séparations digitales qui doivent normalement apparaître vers le stade E12,5. Les membres antérieurs sont plus sévèrement atteints que les postérieurs, avec une fusion des phalanges des doigts 2 et 3 et une absence de phalanges distales pour les doigts 2,3 et 4. L'ectoderme de surface est épaissi, et il est recouvert par du derme issu de cellules mésenchymateuses qui ont migré par des lacunes situés au niveau de l'épiderme distal.

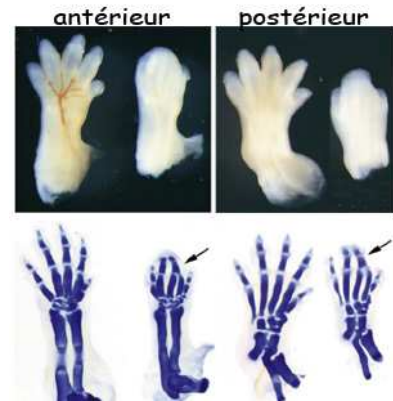


Figure 21 : syndactylie des membres antérieurs et postérieurs. Flèches : fusion des doigts 2 et 3 (Miner et al., 1998)

Dysmorphogénèse placentaire : l'exencéphalie et la syndactylie ne sont probablement pas responsables de la mort des embryons mutants ; en effet des mutants ne présentant pas d'exencéphalie meurent tout de même vers le stade E17 de développement. La membrane de Reichert et le sac vitellin des embryons mutants sont similaires aux contrôles, par contre le labyrinthe placentaire semble clairement malformé. Le labyrinthe est la partie du placenta dans laquelle les circulations embryonnaire et maternelle sont situées à proximité l'une de l'autre et où les échanges de nutriments peuvent se faire. Chez la souris, ce labyrinthe est composé de cellules du trophoblaste et endothéliales qui dérivent toutes de l'embryon. De plus, le labyrinthe est significativement plus petit chez les embryons délétés pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine. La complexité du réseau vasculaire du labyrinthe est réduite et les vaisseaux sanguins présentent une augmentation de leur diamètre. Ceci réduit la surface d'échange des molécules entre la mère et l'embryon, ce qui conduit à une insuffisance placentaire chez le mutant. De plus, chez le mutant, les deux couches de cellules trophoblastiques et endothéliales ne sont pas séparées par une lame basale sur laquelle elles ne peuvent donc pas adhérer. Cette séparation anormale des vaisseaux sanguins fœtaux du trophoblaste a des conséquences dramatiques sur la fonction du placenta, et associé aux défauts de complexité vasculaire permet de proposer une explication plausible à la létalité embryonnaire (Miner et al., 1998).

Défauts de la glomérulogénèse rénale (Miner and Li, 2000): le développement du rein implique de nombreuses ramifications et la conversion de mésenchyme en épithélium. Il aboutit à la formation d'un ensemble de sous-unités fonctionnelles appelé néphron. Dans le néphron, les glomérules, qui contiennent entre autre le flocculus (amas de capillaires sanguins) sont chargés de filtrer le plasma. La lame basale glomérulaire est essentielle à la filtration rénale, et permet également l'adhésion des cellules endothéliales qui bordent les capillaires. Les embryons invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ présentent des défauts dès la mise en place des glomérules rénaux liés à la rupture de la lame basale glomérulaire ; parallèlement, les cellules endothéliales associées ne peuvent plus adhérer à la lame basale et de ce fait sont expulsées vers l'extérieur du glomérule. De plus, certains embryons ne présentent qu'un seul rein ou une absence de rein, montrant un rôle majeur de la chaîne $\alpha 5$ dans la morphogénèse rénale.

Défauts du développement pulmonaire (Nguyen et al., 2002) : les souris invalidées pour le gène *lama5* présentent un défaut architectural au niveau du poumon droit, la séparation lobaire étant incomplète. Normalement chez la souris, le poumon droit est divisé en 4 lobes distincts, contrairement au poumon gauche qui n'a qu'un seul lobe. Cette anomalie est probablement due à l'absence de chaîne $\alpha 5$ dans la lame basale qui borde la plèvre viscérale : c'est en effet la seule chaîne α qui y est présente et son absence n'est pas compensée par d'autres chaînes α . Par contre, le développement des arcs bronchiaux se fait tout à fait normalement, la chaîne $\alpha 5$ n'étant pas ici compensée de façon moléculaire par une expression ectopique de la chaîne $\alpha 4$.

Défauts de migration des cellules de la crête neurale (Coles et al., 2006) : la chaîne $\alpha 5$ de laminine est très fortement exprimée durant l'induction de la crête neurale. Les souris *lama5*^{-/-} ont des voies de migration des cellules de la crête neurale plus étendues que les souris sauvages. Ces données suggèrent que la chaîne $\alpha 5$ de laminine fonctionne comme un signal qui guide et restreint la migration des cellules de la crête neurale, en délimitant leur voie de migration.

Autres défauts de morphogénèse des souris *lama5*^{-/-} : des défauts de morphogénèse des glandes salivaires ont également été décrites dans la littérature (Rebustini et al., 2007). En effet, les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine montrent un retard de croissance de la glande sous-maxillaire et une absence de formation de la glande sublinguale. Les ramifications lobulaires sont réduites et forment des bourgeons dans lesquels les cellules épithéliales sont désorganisées et où la lumière est restreinte.

Au niveau des dents, une anomalie d'organisation de l'épithélium à l'origine du bourgeon dentaire a été observée chez les embryons mutants (Fukumoto et al., 2006).

Enfin, la peau des souris *lama5*^{-/-} ont deux fois moins de follicules pileux que les souris sauvages (Li et al., 2003). Ce phénotype montre encore une fois l'importance de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans des événements de différenciation. En effet, des expériences de greffe de peau d'embryons *lama5*^{-/-} au stade E16 à des souris nude ont montré qu'il n'y avait pas de développement de pilosité, contrairement à ce qui a été observé avec les greffes contrôles. Ces défauts seraient liés à des défauts d'assemblage de la lame basale ainsi qu'à une diminution des marqueurs précoces du développement pileux que sont Sonic Hedgehog et Gli1, ce qui impliquerait que la chaîne $\alpha 5$ de laminine soit requise pour la morphogénèse pileuse via la voie de signalisation Sonic Hedgehog.

III.4.3.2. Rôle au niveau intestinal

Un phénotype intestinal des souris *lama5*^{-/-} a pu être mis en évidence au laboratoire (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Les intestins embryonnaires mutants sont de taille réduite (près de 2 fois comparés aux intestins sauvages) et présentent de nombreuses circonvolutions avec, dans les cas les plus graves, soudure des anses intestinales par fusion des couches musculaires. Par ailleurs, une absence de séreuse et de mésentère a été observée. Le diamètre de l'intestin est quant à lui paradoxalement peu affecté.



Figure 22 : phénotype morphologique intestinal des embryons *lama5*^{-/-} (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Flèches : soudure des anses intestinales, observées à la loupe binoculaire et sur une coupe histologique

Les villosités intestinales se forment normalement, mais il semble également qu'elles soient moins nombreuses que dans les intestins contrôles. On ne note pas de différences au niveau des entérocytes, comme le confirme l'observation en microscopie électronique de l'organisation de la bordure en brosse. De plus, le marquage spécifique des entérocytes par la villine n'a pas montré de différences entre les intestins contrôles et mutants. Par contre, le nombre de cellules à mucus est diminué chez les embryons *lama5*^{-/-}.

Les embryons mutants $\alpha 5^{-/-}$ présentent des défauts majeurs au niveau du muscle lisse. En effet, des observations au microscope électronique à transmission ont pu confirmer que la couche séreuse et les cellules mésenchymateuses étaient plus ou moins dispersées dans les mutants. L'absence de chaîne $\alpha 5$ affecte les processus de différenciation des cellules musculaires lisses comme ont pu le montrer des immunohistochimies avec des anticorps spécifiques du muscle lisse, en effet, on observe une diminution d'expression de la desmine et de l' α -actine de muscle lisse. Par ailleurs, le taux de prolifération des cellules du compartiment mésenchymateux est clairement diminué chez les embryons mutants.

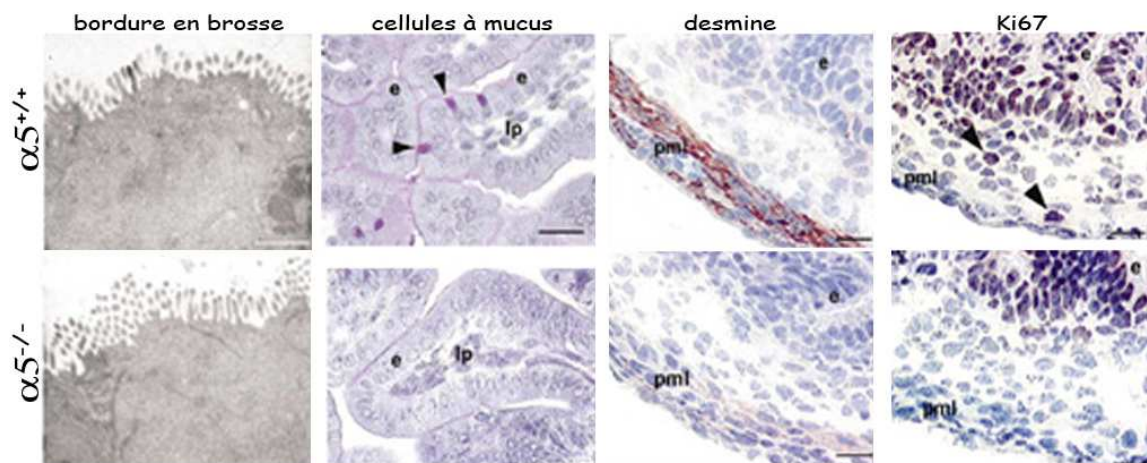


Figure 23 : phénotype histologique intestinal des embryons *lama5*^{-/-}. L'observation au microscope électronique à transmission ne montre pas de différences au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Le nombre de cellules à mucus est diminué dans les intestins mutants comme le montre le marquage à l'acide périodique de Schiff. On observe également des défauts au niveau des cellules musculaires lisses mis en évidence par l'absence de marquage desmine chez les mutants ainsi qu'une baisse significative du nombre de cellules en prolifération (marquage au Ki67) (Bolcato-Bellemin et al., 2003)

L'absence de chaîne $\alpha 5$ au niveau des lames basales intestinales sous-épithéliales entraîne des expressions anormales des autres chaînes de laminines. La lame basale est en effet présente, bien que montrant quelques irrégularités, comme ont pu le montrer des marquages pour le nidogène, le perlecan et le collagène de type IV. Par contre, l'absence de la chaîne $\alpha 5$ entraîne un dépôt ectopique de chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ de laminine (**Figure 24**), sécrétées par le mésenchyme, qui entrent probablement dans un processus de compensation ; ce phénomène

permettrait d'expliquer l'absence de défauts majeurs de morphogénèse des villosités. L'autre conclusion majeure de cette étude est une réduction d'expression des laminines $\beta 2$ et $\gamma 2$, tandis que les chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ restent à un niveau d'expression inchangé. Parallèlement, la perte de la chaîne $\alpha 5$ aboutit également une baisse d'expression de ses récepteurs, que sont les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et le Lutheran.

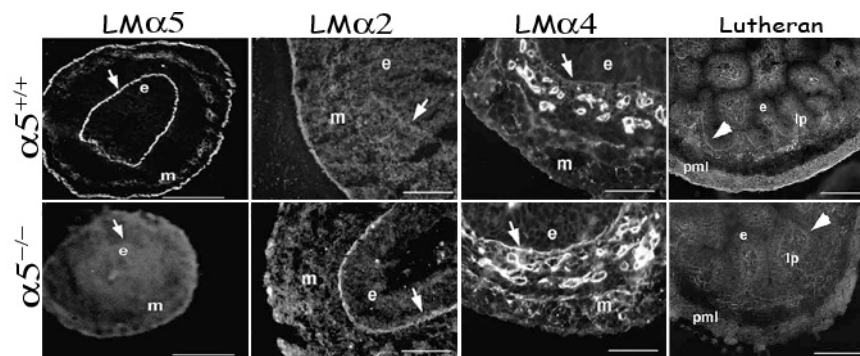


Figure 24 : Expression des chaînes $\alpha 5$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ de laminines et du récepteur Lutheran dans les intestins embryonnaires *lama5*^{-/-} (Bolcato-Bellemin et al., 2003)

Enfin, pour outrepasser la létalité embryonnaire, des intestins embryonnaires de souris invalidées pour le gène *lama5* et de souris contrôles ont été greffés sous la peau de souris nude. Une augmentation des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 4$ mais aussi de la chaîne $\alpha 1$ a été observée dans la lame basale sous-épithéliale. Cette expression ectopique de la chaîne $\alpha 1$ compense probablement l'absence de chaîne $\alpha 5$ et permet d'expliquer que dans ces conditions il n'existe pas de différences morphogéniques évidentes entre les intestins contrôles et mutants à ces stades plus tardifs. En effet, les deux types de greffons ont développé des villosités et des cellules à mucus et les niveaux d'expressions des marqueurs du muscle lisse ne présentent pas de différences chez le greffon mutant par rapport au contrôle.

III.5. La laminine-111

La laminine-111 se compose des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$. Elle joue un rôle particulièrement important lors du développement embryonnaire où elle est un composant essentiel de la membrane de Reichert, membrane extra-embryonnaire synthétisée par les cellules du trophoblaste et de l'endoderme pariétal jouant un rôle de protection contre l'organisme maternel. Les souris invalidées pour le gène *lama1* meurent durant la période précoce de pré-implantation (Alpy et al., 2005; Miner et al., 2004) et seront détaillées dans la section III.5.3.1.

III.5.1. Le gène *lama1*

Chez l'homme, le gène *LAMA1* a été localisé sur le chromosome 18p11.3. Chez la souris, il se trouve sur le chromosome 17. Le promoteur de ce gène a été étudié en partie au laboratoire (Piccinni et al., 2004) et a montré que dans les régions proximales des promoteurs des gènes humain et murin se trouvent des séquences hautement conservées ; on ne trouve pas de boîtes TATA ou CCAAT, phénomène également observé pour d'autres gènes de laminines. Le promoteur du gène murin présente un motif riche en résidus GC qui permet la liaison de facteurs de transcription Sp1 (qui est un facteur de transcription général des eucaryotes composé de 3 doigts de zinc se fixant sur les motifs GC). Ce motif est crucial pour l'activité transcriptionnelle de base du promoteur. De plus, cette région proximale inclut un élément de fixation « Krüppel-like ». De façon intéressante, l'équipe a pu démontrer que les facteurs

KLF4 et KLF5 ont des effets régulateurs du promoteur *lama1* dans les cellules intestinales : KLF5 agit de façon positive tandis que KLF4 régule négativement ce gène. Par ailleurs, un groupe japonais a identifié une séquence au niveau de la partie 5' du promoteur qui favoriserait la différenciation de l'endoderme pariétal et serait régulée par les facteurs SOX7 et 17 (Niimi et al., 2003).

III.5.2. Expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine

L'origine cellulaire de la chaîne $\alpha 1$ de laminine a pu être mise en évidence au laboratoire, comme nous l'avons vu précédemment par des expériences d'intestins hybrides. Elle est sécrétée à la fois par les cellules épithéliales et par les cellules mésenchymateuses (Simon-Assmann et al., 2010a). L'expression de la chaîne $\alpha 1$, qui débute dès le stade 16 cellules, est particulièrement importante lors de l'embryogenèse, aussi bien au niveau de l'embryon lui-même qu'au niveau de ses annexes (Ekblom et al., 2003). La chaîne $\alpha 1$ est fortement exprimée lors de la morphogenèse de nombreux organes, comme le rein, le poumon et la glande mammaire. Dans l'intestin, elle est présente dans la lame basale sous-épithéliale où elle se confine, au fur et à mesure du développement, à la partie intervillitaire puis au fond des glandes (voir **figure 19**). Chez l'adulte, son expression diminue et se confine à certains organes, en particulier le rein et l'œil (Virtanen et al., 2000).

Au niveau de l'intestin, son expression est très fortement réduite par rapport aux stades embryonnaires. Dans l'intestin grêle, aussi bien chez l'homme que chez la souris, elle se confine dans la lame basale sous-épithéliale située dans la région des cryptes, et entourant les glandes de Brünner du duodénum (Virtanen et al., 2000) et U682, données personnelles. Au niveau du côlon, elle n'est pas exprimée chez l'humain. Chez la souris, par contre, nous avons observé au laboratoire que son expression dépendait du fond génétique : l'expression est absente ou très faible pour les souris CD1 et est présente dans le fond des glandes du côlon proximal pour les souris C57Bl6. Il n'y a par contre aucune expression de cette chaîne au niveau du côlon distal.

III.5.3. Rôle de la chaîne $\alpha 1$ de laminine

III.5.3.1. Dans le développement embryonnaire

Au laboratoire, un modèle de souris conditionnellement invalidé pour la chaîne $\alpha 1$ a été développé (Alpy et al., 2005) afin de pallier la létalité embryonnaire. Pour ce faire, des souris floxées pour le gène *lama1* ont dans un premier temps été générées : elles ne montrent aucun phénotype particulier. Ces souris sont ensuite croisées avec des souris CMV-Cre (promoteur du cytomégalo virus, qui est un promoteur fort et ubiquitaire) : leur descendance meurt vers le stade E6,5 à cause d'une absence de la membrane de Reichert. L'une des causes de la mortalité des embryons mutants est probablement l'induction de l'apoptose qui a pu être mise en évidence, alors que la prolifération ne semble pas altérée. Ces embryons présentent des défauts au niveau de la différenciation de l'endoderme pariétal et viscéral, caractérisés par une expression altérée de la cytokératine 19 et de GATA4. GATA4 est un facteur de transcription exprimé par l'endoderme viscéral, tandis que la cytokératine 19 est exprimée par l'endoderme pariétal et les cellules trophoblastiques. Chez les embryons mutants, GATA4 est exprimé dans moins de cellules et selon un patron d'expression totalement désorganisé comparé au contrôle, ce qui tend à montrer un dérèglement de l'endoderme viscéral.

III.5.3.2. Dans la différenciation intestinale

Des expériences de culture cellulaire ont pu montrer que la chaîne $\alpha 1$ est impliquée dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En effet, la culture de cellules Caco2

(cellules humaines issues d'adénocarcinome colique capables d'exprimer des marqueurs de différenciation caractéristiques des cellules épithéliales intestinales matures) sur laminine-111 montre une augmentation du niveau d'expression du gène *Cdx2*, gène clé de la différenciation cellulaire intestinale (Turck et al., 2006).

L'inhibition de la chaîne $\alpha 1$ par des siRNA dans ces mêmes cellules Caco2 a montré une sécrétion incorrecte des autres chaînes formant la laminine-111 : $\beta 1$ et $\gamma 1$. De plus, le collagène de type IV n'est pas correctement déposé non plus, et les marqueurs fonctionnels des entérocytes sont très peu exprimés, voire absents (De Arcangelis et al., 1996). Il a aussi pu être montré au laboratoire une corrélation positive entre le niveau d'expression des taux d'ARNm de la chaîne $\alpha 1$ et la saccharase-isomaltase, montrant le potentiel rôle de cette chaîne dans la différenciation des cellules intestinales (De Arcangelis et al., 1996).

Les souris floxées pour le gène *lama1* générées par les Drs. Lefebvre et Alpy ont également été croisées avec des souris Sox2-Cre, c'est-à-dire qui expriment la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur Sox2. Le but de cette expérience était d'invalider l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans l'embryon en conservant la membrane de Reichert, Sox2 étant exprimé dans l'épiblaste embryonnaire, duquel dérive l'embryon, mais pas dans les annexes extra-embryonnaires. Les souris issues de ce croisement sont parfaitement viables et fertiles, bien qu'elles n'expriment absolument pas la chaîne $\alpha 1$. Ce phénotype pourrait s'expliquer par des phénomènes compensatoires dans les divers tissus par d'autres chaînes de laminine. Ces souris *lama1* floxées ont aussi été croisées avec des souris Villine-Cre, pour générer une délétion au niveau de l'épithélium intestinal. Cependant, les analyses actuelles montrent qu'aucun des paramètres développementaux, histologiques ou fonctionnels ne sont affectés.

III.5.3.3. Dans la différenciation rétinienne

Dans certaines lames basales, la chaîne $\alpha 1$ de laminine n'est pas compensée par d'autres chaînes α . C'est le cas de la lame basale rétinienne. Notre groupe a pu montrer que lorsque la chaîne $\alpha 1$ est délétée au niveau de cette lame basale, c'est toute sa structure qui est altérée au niveau de la membrane limitante interne, ce qui mène à un nombre réduit de cellules ganglionnaires et à une désorganisation des cellules gliales. Il existe également des anomalies au niveau du système vasculaire de la rétine ; de manière intéressante, des tests optomoteurs montrent que ces souris sont aveugles (Edwards et al., 2010). Ces données suggèrent que certaines pathologies humaines oculaires pourraient être dues à des défauts d'expression de la chaîne $\alpha 1$.

III.6. Récepteurs de la chaîne $\alpha 5$ de laminine

Les laminines agissent sur les cellules en activant diverses voies de signalisation. Elles interagissent alors avec des récepteurs membranaires. Dans cette partie seront succinctement décrits les principaux récepteurs qui lient la chaîne $\alpha 5$ de laminine (pour revue, voir Durbeej, 2010).

III.6.1. Les intégrines (Barczyk et al., 2010; Takada et al., 2007)

Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β associées de façon non-covalente. Chez les vertébrés, on trouve 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , qui peuvent s'assembler en 24 hétérodimères. La sous-unité α détermine en général la spécificité du ligand.

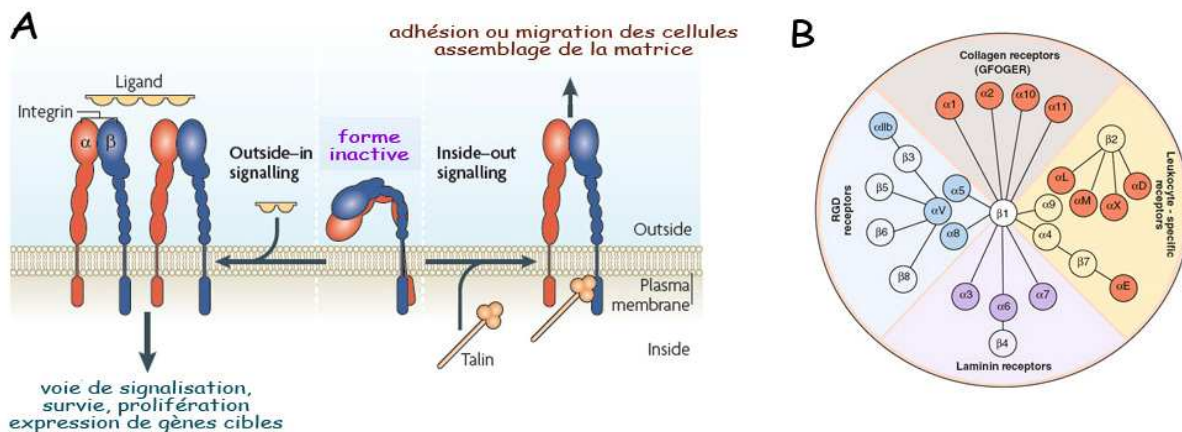


Figure 25 : activation des intégrines et présentation de la famille des intégrines avec leur ligands (d'après respectivement Barczyk et al., 2010; Shattil et al., 2010)

On peut distinguer plusieurs domaines sur les intégrines : le domaine cytoplasmique (partie COOH-terminale) le domaine transmembranaire et le domaine extracellulaire qui consiste en un domaine globulaire terminal permettant la liaison aux ligands. Dans sa conformation inactive, l'affinité au ligand des domaines globulaires est faible. Le mécanisme d'activation des intégrines reste controversé ; deux types de signaux ont ainsi été décrits : de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out) et de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in). Dans le type inside-out, une molécule cytoplasmique comme par exemple la taline (élément du cytosquelette) va activer l'intégrine pour augmenter son affinité pour la matrice extracellulaire et conduire ainsi à des signaux permettant l'adhésion ou la migration cellulaire, ou encore l'assemblage de la matrice extracellulaire. Dans le processus inverse outside-in, c'est la liaison à la matrice extracellulaire, donc au ligand, qui va activer l'intégrine et permettre de médier un signal conduisant à la survie ou à la prolifération de la cellule, ou encore à l'expression de gènes cibles. D'un point de vue conceptuel, ces deux procédés sont séparés mais en réalité ils sont très liés : par exemple l'activation inside-out peut activer l'intégrine et ainsi augmenter son affinité pour le ligand extracellulaire ce qui débouchera sur un signal outside-in (pour revue voir Shattil et al., 2010).

Les intégrines spécifiques des cellules épithéliales de l'intestin sont présentées **figure 19** (partie III.3.4.). La chaîne $\alpha 5$ de laminine peut se lier dans l'intestin aux intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 7\beta 1$ (Durbeej, 2010). Quelques modèles d'inactivation ont pu mettre en évidence le rôle des intégrines dans la morphogenèse intestinale. Une inactivation conditionnelle de la chaîne $\beta 1$ d'intégrine dans l'épithélium intestinal entraîne une létalité post-natale due à une sévère malnutrition (Jones et al., 2006). Aucun défaut de l'adhésion cellulaire ou de formation de la lame basale n'a été observé, mais de façon surprenante, ces souris présentent une forte augmentation de la prolifération épithéliale. Ces données suggèrent que la fonction principale de l'intégrine $\beta 1$ n'est donc pas l'ancrage des cellules mais plutôt l'induction de la prolifération des cellules épithéliales régulée par la matrice extracellulaire. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est exprimée dans les cellules intestinales épithéliales tout le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin, aussi bien dans les cryptes que dans les villosités ; sa localisation est baso-latérale. Des souris déficientes pour les chaînes $\alpha 6$ ou $\beta 4$ présentent un décollement sévère de l'épiderme et une létalité post-natale (Georges-Labouesse et al., 1996; Niessen et al., 1996). L'équipe du Dr. Georges-Labouesse a produit un modèle de souris invalidées pour la chaîne $\alpha 6$ d'intégrine spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Ces animaux développent des lésions intestinales inflammatoires chroniques et un prolapsus

rectal. A plus ou moins long terme, ces animaux développent des tumeurs malignes (Georges-Labouesse et al., communication présentée au CECED 2009 à Strasbourg).

III.6.2. Le dystroglycan et le Luthéran

Le dystroglycan se compose de deux sous-unités. L' α -dystroglycan est la partie extracellulaire qui va se lier aux ligands de la matrice extracellulaire. Le β -dystroglycan est transmembranaire et relie l' α -dystroglycan au cytosquelette d'actine via des molécules comme la dystrophine (Winder, 2001). Le dystroglycan peut entre autres lier les chaînes $\alpha 5$, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de laminine (Durbeej, 2010). Son invalidation chez la souris entraîne une létalité embryonnaire due à l'absence de membrane de Reichert (Williamson et al., 1997). Au niveau de l'intestin, le dystroglycan est exprimé dans la région de la lame basale sous-épithéliale et soulignant les muscles lisses (Durbeej et al., 1998 et INSERM U682, données de l'équipe).

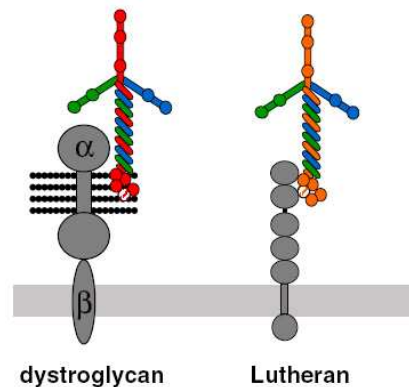


Figure 26 : schéma représentant les récepteurs dystroglycan et Luthéran (adapté de Durbeej, 2010)

Le Luthéran est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est un récepteur exclusif des laminines, et à priori il ne lie que les laminines contenant la chaîne $\alpha 5$ (Kikkawa et al., 2002). Le Luthéran est exprimé chez l'homme et la souris dans de nombreux tissus lors du développement et chez l'adulte, incluant l'intestin : il est localisé au niveau basal des cellules épithéliales et dans les cellules musculaires en regard des lames basales contenant la chaîne $\alpha 5$ de laminine (Eyler and Telen, 2006; Rahuel et al., 2008). Les souris invalidées pour le Luthéran se développent normalement, mais dans l'intestin les couches musculaires sont épaissies avec une désorganisation des myofilaments et de la lame basale des couches musculaires lisses (Rahuel et al., 2008 et thèse de Léa Ritié-Pertusa, 2008).

III.7. Les Ténascines

Les ténascines (TN) sont une famille de glycoprotéines présentes dans les tissus conjonctifs de nombreux organes. Chez les vertébrés, on trouve 4 gènes codants pour 4 types de ténascines : ce sont les ténascines-C, -R, -X et -W. Dans ce mémoire, nous nous focaliserons sur les isoformes TNC et TNW.

III.7.1. Structure (Chiquet-Ehrismann, 2004; Hsia and Schwarzbauer, 2005)

Chaque molécule protéique contient des modules EGF-like, des domaines fibronectine de type III et un domaine globulaire terminal partagé avec les fibrinogènes. Les différents modules sont alignés en collier de perle, pour donner des molécules longues et étendues. Au niveau de la partie NH_2 -terminale, chaque ténascine a un domaine d'oligomérisation, qui permet, pour les isoformes -C et -W, la formation d'un hexamère (Figure 27). Dans le cas de

la TNC, il peut y avoir un phénomène de splicing alternatif, qui résulte en une multitude de sous-unités de TNC qui diffèrent dans le nombre et l'identité des répétitions de fibronectine de type III.

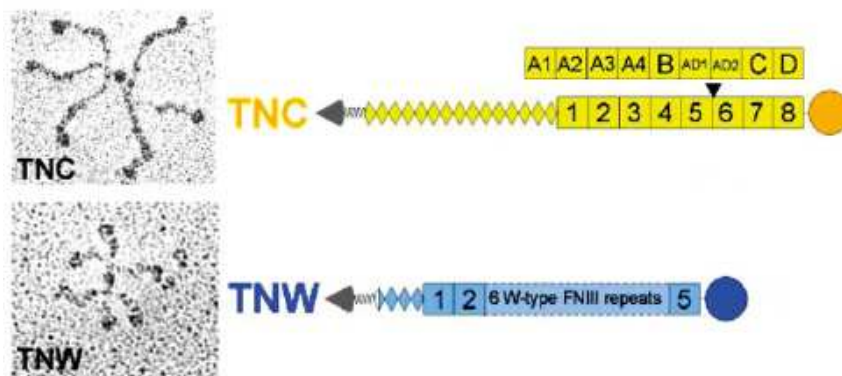


Figure 27 : structure des ténascines-C et -W. (D'après Chiquet-Ehrismann, 2004)

III.7.2. Expression (pour revues, voir Brellier et al., 2009; Jones and Jones, 2000)

Les ténascines sont principalement synthétisées par les cellules du tissu conjonctif. Chaque isoforme a un patron d'expression qui lui est propre. La TNC est fortement exprimée durant le développement embryonnaire, puis son expression chute et se restreint chez l'adulte à des organes spécifiques, comme par exemple au niveau des os, des tendons ou des reins. Dans l'intestin, elle est présente au niveau des muscles lisses et de la région proche de la lame basale (Probstmeier et al., 1990; Simon-Assmann and Kedinger, 1993). Son expression peut réapparaître ou s'intensifier dans les organes lors de pathologies comme les infections, l'inflammation ou la tumorigenèse. Un autre important mécanisme d'induction est le stress mécanique qui peut être appliqué à des cellules en culture ou *in vivo* (Chiquet-Ehrismann et al., 1994).

Le terrain d'expression de la TNW est plus restreint comparé à la TNC. On la trouve lors du développement embryonnaire dans les os, le cartilage, les ligaments et les muscles lisses. Elle se cantonne chez l'adulte à l'os cortical, au cerveau, aux reins et à la rate. Elle est absente du tractus digestif normal.

III.7.3. Rôle biologique

Les ténascines, contrairement à la plupart des molécules de la matrice extracellulaire, ne favorisent pas l'attachement des cellules, mais ont plutôt un rôle antiadhésif, comme le démontre l'inhibition de l'adhésion de plusieurs types cellulaires à la fibronectine par la TNC (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000).

Durant l'embryogenèse, la TNC est synthétisée par de nombreuses variétés de cellules. Elle pourrait ainsi aider à orchestrer le développement en déterminant si les cellules doivent adhérer au substrat, ou au contraire migrer, se différencier ou se diviser (Jones and Jones, 2000). Dans les tissus adultes, l'expression de TNC est induite lors de la néovascularisation, ou la cicatrisation des tissus, ainsi que dans les tissus qui sont soumis à des forces biomécaniques - comme les tendons par exemple (Jones and Jones, 2000). Deux modèles de souris déficientes pour la TNC ont été générées par deux laboratoires indépendants (Forsberg et al., 1996; Saga et al., 1992). Elles présentent des anomalies du système nerveux, dont une déficience de la plasticité synaptique de l'hippocampe. De plus, ces souris montrent également des défauts des processus de régénération, comme par exemple une ré-innervation anormale du muscle squelettique (Cifuentes-Diaz et al., 2002). Le phénotype finalement peu

dramatique de ces souris invalidées pour une molécule présente dans une grande majorité des organes pendant le développement peut peut-être s'expliquer par des phénomènes de compensation moléculaire : en effet, la TNR et la TNW sont également exprimées dans le système nerveux, et la TNX est exprimée dans les tissus conjonctifs. Une autre possibilité est que d'autres molécules de la matrice extracellulaire, qui partagent des récepteurs communs avec la TNC puissent également exercer un rôle compensatoire (Jones and Jones, 2000).

Concernant la TNW, tout comme la TNC elle ne favorise pas l'adhésion des cellules *in vitro*. Par contre, elle n'inhibe ni l'étalement des cellules cancéreuses sur la fibronectine (Degen et al., 2007), ni ne favorise leur prolifération (Scherberich et al., 2005). Dans les tissus normaux, son importante expression dans les tissus osseux semble indiquer un rôle dans l'ostéogenèse. Des études récentes ont entre autres pu montrer que de la TNW recombinante purifiée pouvait promouvoir la migration des ostéoblastes et stimuler la minéralisation *in vitro* (pour revue, voir Martina et al., 2010).

III.7.4. Implication dans les pathologies

Dans des conditions pathologiques, la ténascine-C est souvent augmentée. Cette surexpression peut être soit la cause, soit la conséquence de la pathologie (Brellier et al., 2009). Un dépôt anormal de TNC au niveau de la lame basale du poumon est par exemple caractéristique de l'asthme. Cette maladie est caractérisée par une inflammation chronique du système respiratoire avec une hypertrophie des muscles lisses entourant les voies aériennes, une hypersécrétion de mucus et une modification de la composition en éléments de la matrice extracellulaire. De façon intéressante, une corrélation positive entre l'épaisseur de la couche de TNC et le nombre de mastocytes a été observée chez les sujets allergiques (Amin et al., 2000). Il a récemment été montré que les traitements anti-asthme par inhalation de corticoïdes régulaient négativement l'expression de TNC par les fibroblastes du poumon, alors que la fibronectine était activée (Degen et al., 2009).

Dans l'arthrite rhumatoïde, la TNC est fortement exprimée dans la région inflammatoire. Des cultures de macrophages et de fibroblastes issus de la synovie de patients atteints de cette pathologie ont permis de mettre en évidence un rôle inducteur de la TNC sur la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via l'activation du TLR4 (Midwood et al., 2009), ce qui contribue à entretenir l'inflammation et la destruction des tissus.

Les molécules de TNC et TNW tiennent également un rôle important dans les processus de tumorigenèse ; cet aspect sera développé dans la partie III.8.2.2.

III.8. Lien entre les molécules de la matrice extracellulaire, les MICI et le cancer colorectal

III.8.1. Implication des molécules de laminines et de la TNC dans les MICI

Les MICI sont caractérisées par une succession de phases d'ulcérations suivies de phases de réparations de la muqueuse. Durant ces deux étapes, les éléments de la matrice extracellulaire sont soit dégradés, soit sollicités pour cicatrifier la muqueuse. L'épaississement de la muqueuse et donc la fibrose est l'un des symptômes associés à ces maladies.

Quelques études ont décrit une augmentation du collagène de type IV et des laminines dans le sérum de patients atteints de MICI (Heikius et al., 2002; Koutroubakis et al., 2003). Une étude récente a révélé un nouveau locus de susceptibilité à la rectocolite hémorragique dans une

région du chromosome 7q31, où un candidat solide serait le gène *LAMB1*, codant pour la chaîne $\beta 1$ de laminine (Barrett et al., 2009). A ma connaissance, une seule étude a tenté d'établir un patron d'expression de certaines chaînes de laminine dans la maladie de Crohn, et cela uniquement dans la maladie localisée au niveau de l'intestin grêle. Ce travail a permis de mettre en évidence une expression ectopique des chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 5$ (dans la publication il est fait mention de la chaîne $\alpha 1$, mais l'anticorps utilisé reconnaît en fait $\alpha 5$) au niveau des cryptes (Bouatrouss et al., 2000).

La ténascine-C peut être surexprimée dans les tissus inflammés. Elle est en effet régulée par des cytokines pro-inflammatoires et par des facteurs de croissance. Les membres de la famille du TGF β sont d'importants régulateurs de la synthèse de la matrice extracellulaire, à la fois durant le développement et les processus de régénération. Ils sont produits par les cellules épithéliales et mésenchymateuses, ainsi que par les leucocytes (Pohlers et al., 2009). Le premier facteur de croissance décrit pour réguler positivement la TNC est le TGF- $\beta 1$, qui est lui-même régulé par l'IL-1, pro-inflammatoire, ce qui peut expliquer l'apparition précoce de la TNC dans les phénomènes d'inflammation (pour revue, voir Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Plus récemment, d'autres interleukines ont été signalées comme stimulatrices de la TNC. Il est cependant intéressant de noter que la TNC est aussi stimulée par des cytokines dites « anti-inflammatoires » et on peut donc émettre l'hypothèse que cette molécule pourrait jouer un double rôle en régulant l'étendue de l'inflammation. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la TNC inhibait l'adhésion des monocytes, ainsi que l'activation des cellules T *in vitro* (Ruegg et al., 1989). Le lien entre les voies de signalisation impliquant des cytokines et la TNC pourrait être établi via des facteurs de transcription comme le NF- κ B, qui sont capables de réguler l'expression du promoteur du gène codant pour la TNC (Mettouchi et al., 1997). Dans les MICI, la TNC est augmentée dans le sérum des patients, ainsi que dans la muqueuse inflammée (Dueck et al., 1999; Riedl et al., 2001).

III.8.2. Implication des laminines et des ténascines dans le cancer colorectal

III.8.2.1. Rôle des laminines, et plus particulièrement des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ dans le cancer colorectal

Des études ont pu montrer un rôle des laminines dans les processus de tumorigenèse (pour revue, voir Patarroyo et al., 2002), comme par exemple une forte expression de la chaîne $\gamma 2$ au front d'invasion (Tsubota et al., 2010). Nous allons ici nous concentrer sur le rôle que pourraient jouer les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminine dans le cancer colorectal.

Des études menées dans notre groupe ont permis de mettre en évidence le rôle de la chaîne $\alpha 1$ dans la croissance tumorale. En effet, des cellules HT29, qui sont des cellules issues de cellules cancéreuses coliques et qui n'expriment pas la chaîne $\alpha 1$, ont été transfectées avec un vecteur d'expression de la chaîne $\alpha 1$. Ces cellules transfectées injectées à des souris nude produisent des tumeurs de tailles plus importantes comparées aux tumeurs dérivant de cellules non transfectées. Par ailleurs, les tumeurs provenant des cellules surexprimant la chaîne $\alpha 1$ sont plus richement vascularisées (De Arcangelis et al., 2001).

Par la suite, des études menées dans l'équipe sur des prélèvements coliques humains ont montré une augmentation de l'expression de la chaîne $\alpha 1$, à la fois par immunofluorescence et par RT-qPCR (données non publiées, Dr Lefebvre et M^{elle} Biasch, **figure 28**). Par ailleurs, un modèle murin de surexpression de la chaîne $\alpha 1$ dans l'épithélium intestinal grâce à un promoteur villine a permis de confirmer que la chaîne $\alpha 1$ favorisait la progression tumorale (thèse Ivo Jivkov, 2008). Le mécanisme exact et les voies de signalisation impliquées dans l'action activatrice de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans la tumorigenèse sont en cours d'étude

dans notre groupe. Toutefois, il est établi que le clivage de la chaîne $\alpha 1$ de laminine par des métalloprotéases aboutit à la formation de peptides jouant à la fois un rôle dans l'activation de l'angiogenèse, et dans la croissance tumorale (Engbring and Kleinman, 2003; Simon-Assmann et al., 2010b).

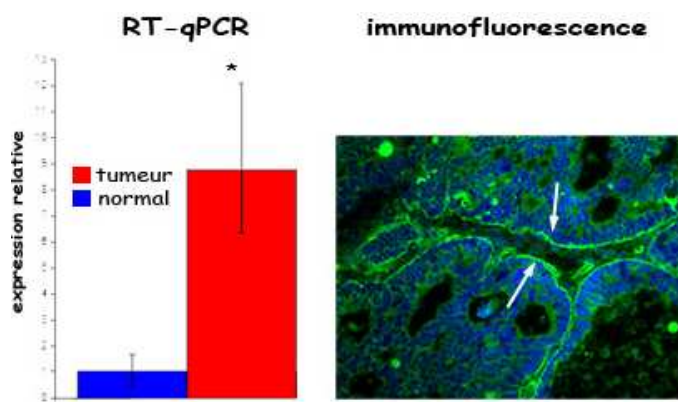


Figure 28 : mise en évidence de la surexpression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans les cancers colorectaux humains au niveau de l'ARN messager (RT-PCR et RT-qPCR) et au niveau protéique (immunofluorescence)

N = normal T= tumeur. n=33, p<0,05

Flèches = lame basale

Données du Dr. Lefebvre et de M^{elle} Biasch

Une hypothèse supplémentaire pourrait être que le mécanisme d'action de la chaîne $\alpha 1$ sur la tumorigenèse serait indirect. En effet, les études précitées menées sur la chaîne $\alpha 1$ ont également montré que la surexpression de cette chaîne entraîne conjointement un dépôt accentué de laminine-511 (De Arcangelis et al., 2001). L'analyse préliminaire de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ dans 15 prélèvements de carcinomes coliques (collaboration avec la tumorotheque du CHRU de Strasbourg) a révélé une forte expression de cette chaîne dans les glandes coliques tumorales mais uniquement dans des zones encore bien structurées et différenciées (thèse de Léa Ritié-Pertusa). Au contraire, au niveau des régions les plus altérées des carcinomes coliques étudiés, une forte diminution, voire une absence de la chaîne $\alpha 5$ a été observée, probablement due à son clivage par des métalloprotéases. De manière intéressante, le gène codant pour la chaîne $\alpha 5$ est localisé sur le bras long du chromosome 20, qui est amplifié dans une grande proportion des tumeurs coliques (Durkin et al., 1997; Tsafirir et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère fortement un rôle des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminine dans les processus de la tumorigenèse colorectale.

III.8.2.2. Implication des TNC et TNW dans le cancer colorectal

La TNC est fortement exprimée dans le microenvironnement des tumeurs. Cette activation d'expression suggère fortement que la TNC est un déterminant clé du stroma tumoral. En effet, de nombreuses études montrent l'implication de la TNC dans la croissance tumorale, l'angiogenèse, l'inhibition de la surveillance immunitaire ou l'induction de métastases (pour revues, voir Midwood and Orend, 2009; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006). Parmi les tumeurs étudiées, la TNC est fortement surexprimée dans les cancers colorectaux, comme ont pu le mettre en évidence des dosages de sérum des patients et des immunohistochimies (Beiter et al., 2005; Dueck et al., 1999). La majorité des études s'accordent pour dire qu'une surexpression de TNC dans les tumeurs coliques est de mauvais pronostic (Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006).

Alors qu'elle est absente du tissu colique non tumoral, la TNW est activée dans le cancer colorectal (Degen et al., 2008). Son expression dans les tumeurs coliques est exclusivement stromale, et elle pourrait jouer un rôle dans la migration des cellules tumorales ainsi que dans l'angiogenèse (Martina et al., 2010).

Résultats

Partie 1 : Étude du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin au cours du développement et dans l'organe mature

I. Recherche des gènes cibles et des voies de signalisation régulées par la chaîne $\alpha 5$ de laminine afin de déterminer son rôle biologique dans l'intestin

Lors de son travail de thèse, Léa Ritié-Pertusa a recherché les gènes cibles de la chaîne $\alpha 5$ de laminine au moyen d'une hybridation différentielle sur puces à ADNc. Elle a ainsi comparé les transcriptomes d'intestins embryonnaires au stade E15,5 de souris sauvages et de souris invalidées pour la chaîne $\alpha 5$. Une fois ces gènes cibles identifiés, elle a recherché les voies de signalisation induites par la chaîne $\alpha 5$. **Ma participation à ce travail a consisté à confirmer la dérégulation de certains des gènes cibles apparentés à la voie Wnt et à démontrer le lien entre l'invalidation de la chaîne $\alpha 5$ et cette voie de signalisation.** L'ensemble de ces travaux est résumé dans la publication 1 (soumise à publication).

II. Résumé des résultats de la publication 1

L'intérêt de l'étude de la chaîne $\alpha 5$ de laminine et de la recherche des voies de signalisation qu'elle pourrait réguler est lié au fait que l'expression de cette chaîne est modifiée dans les pathologies intestinales humaines. En effet, des analyses immunohistochimiques réalisées au laboratoire ont montré que la chaîne $\alpha 5$ était fortement surexprimée dans la région des cryptes de prélèvements d'intestins grêles et de côlons de patients atteints de maladies comme les colites collagèneuses ou les diarrhées rebelles de l'enfant (**Figure 1, publication 1**).

Il était donc intéressant d'étudier le rôle spécifique de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin par une analyse transcriptomique de tissus dont le taux endogène de *lama5* est altéré. Nous avons démarré en réalisant cette étude sur des tissus murins invalidés, souris qui nous avaient été données en collaboration avec le Dr. Miner. Les résultats ont révélé une diminution de l'expression de gènes de différenciation épithéliale et musculaire en absence de chaîne $\alpha 5$ de laminine (**Figure 2, publication 1**). Le travail de thèse de Léa Ritié-Pertusa a permis de confirmer le phénotype musculaire des intestins de souris *lama5*^{-/-} au niveau moléculaire 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, le récepteur de la cholécystokinine A et le neuropeptide Y. De plus, l'absence de la chaîne $\alpha 5$ engendre une sous-expression de gènes liés à la fonction épithéliale comme ceux impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol et une chute d'expression de gènes codant pour les enzymes digestives, Méprine1A et Dipeptidylpeptidase IV (**Figures 2 et 3, publication 1**).

Des gènes impliqués dans deux voies de signalisation, les voies Wnt et PI3K/Akt ont été trouvés dérégulés en absence de chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin. Comme mentionné précédemment, mon investissement dans ce travail est plus particulièrement lié à la voie Wnt. Ainsi, la surexpression de l'inhibiteur Sfrp2 et de certains gènes cibles tels Pitx2, Msx1 et MyoD1 dans les embryons invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine a été confirmée par RT-qPCR, hybridation *in situ* et immunofluorescence (**Figure 4A et B, publication 1**). Par ailleurs, l'invalidation de la chaîne $\alpha 5$ par des siRNA dans des cellules intestinales a permis de confirmer la dérégulation de MyoD1 mais également de Hlx1, suggérant ainsi une régulation directe entre la chaîne $\alpha 5$ et ses gènes cibles (**Figure 4D, publication 1**). Afin d'étudier plus directement le lien entre la chaîne $\alpha 5$ de laminine et la voie Wnt, des cellules ont été

transfectées avec les plasmides du système TOPflash rapporteur de l'activation de la β -caténine. Cet outil a permis de montrer que la chaîne $\alpha 5$ de laminine inhibait la voie Wnt canonique (**Figure 5, publication 1**).

Concernant la voie PI3K/Akt, la laminine-511 stimule l'expression et l'activité du facteur de survie Akt (**Figure 6, publication 1**) mais uniquement dans les cellules épithéliales intestinales. Cette activation se traduit par un changement morphologique des cellules. De plus, l'absence de la chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin embryonnaire entraîne une diminution d'expression de ce facteur Akt (**Supplementary figure 3, publication 1**). Des expériences *in vitro* ont pu démontrer que la laminine-511 protégeait les cellules de l'apoptose via l'activation d'Akt, et activait la prolifération et la migration des cellules (**Figure 7, publication 1**).

Ces résultats mettent en évidence l'implication de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans différents processus. La modulation des voies de signalisation Wnt et PI3K/Akt permet ainsi à la laminine-511 de jouer un rôle important dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication 1. A la suite, un chapitre présente les résultats complémentaires qui approfondissent ce travail par la recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin adulte, en utilisant un modèle murin d'inactivation conditionnelle, et par l'établissement de lignées épithéliales intestinales adultes invalidées pour la chaîne $\alpha 5$.

- **III. Publication 1 : Abnormal Wnt and PI3Kinase signaling in the malformed intestine of *lama5* deficient mice.** Léa Ritié *, Caroline Spenlé *, Joël Lacroute, Anne-Laure Bolcato-Bellemin, Olivier Lefebvre, Christine Bole-Feysot, Bernard Jost, Michèle Kedinger, Dominique Bagnard, Gertraud Orend, Patricia Simon-Assmann. En soumission **p. 65**
- **IV. Résultats complémentaires : modèle murin d'inactivation conditionnelle et établissement de lignées épithéliales intestinales adultes invalidées pour la chaîne $\alpha 5$** **p. 97**

III. Publication 1: Abnormal Wnt and PI3Kinase signaling in the malformed intestine of *lama5* deficient mice

Abnormal Wnt and PI3Kinase signaling in the malformed intestine of *lama5* deficient mice

Léa Ritié ^{1,4} *, Caroline Spenlé ^{1*}, Joël Lacroute ¹, Anne-Laure Bolcato-Bellemin ², Olivier Lefebvre ¹, Christine Bole-Feysot ³, Bernard Jost ³, Michèle Kedinger ¹, Dominique Bagnard ¹, Gertraud Orend ¹, Patricia Simon-Assmann ¹
¹ Inserm, U682, Strasbourg, F-67200 France; Univ de Strasbourg, F-67000 France; ² Polyplus-transfection, Illkirch, France; ³ Microarray and Sequencing Platform, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France; ⁴ present address: Laboratoires SVM, Schirmeck, France; * first co-authors.

Short Title: laminin $\alpha 5$ gene expression signature

This work has been supported by Inserm, by the Association pour La Recherche sur le Cancer (ARC), the Institut National du Cancer (PSA, GO), and the Hopital Hautepierre, Strasbourg (GO). LR and CS were recipients of fellowships from ARC (LR) and the Ligue contre le Cancer (CS).

BM: basement membrane; ECM: extracellular matrix; LM $\alpha 5$: laminin $\alpha 5$; PI3K: Phosphatidyl-inositol 3 Kinase

Correspondence: Patricia SIMON-ASSMANN, Inserm U682
3, Avenue Molière 67200 Strasbourg- France
E-mail: Patricia.Simon-Assmann@inserm.fr
Phone: (33) 3 88 27 53 56 - Fax: (33) 3 88 26 35 38

Conflicts of interest: The authors disclose no conflicts

Author contribution:

LR and CS: study concept and design; acquisition of data; analysis interpretation of data; drafting of the manuscript

JL: acquisition of data

ALBB: acquisition and interpretation of data

OL: study design and acquisition of data

CBF and BJ: microarray data

MK: intellectual content and funding

DB: acquisition of data

GO: critical revision of the manuscript

PSA: study concept, design and supervision; drafting of the manuscript; funding

Background & Aims: Laminin-511 is a major component of the BM and plays an essential role during embryonic development and tissue homeostasis. LM α 5 deficient mice are embryonic lethal and exhibit a malformed intestine. LM α 5 expression abnormalities are also found in human pathologies of the gut. The aim of the study is to identify signaling molecules downstream of laminin-511 and to decipher their role in gut homeostasis.

Methods: We determined gene expression in intestinal tissue from LM α 5 deficient embryos by mRNA profiling. Gene function and signaling pathways triggered by laminin-511 were further analyzed by in vitro experiments including knock down of *lama5* by small interfering RNAs. Expression of LM α 5 was also determined in human gut tissue with pathological signs.

Results: The LM α 5 chain is an important determinant of the embryonic intestinal gene expression signature. Lack of LM α 5 results in downregulation of genes that are involved in differentiation of the intestinal endoderm and mesoderm. Laminin-511 promoted cell spreading and survival in a PI3K dependent manner, and triggered migration and proliferation. Laminin-511 repressed canonical Wnt signaling in cultured cells and was activated in the LM α 5 deficient intestine. Wnt signaling presumably has triggered muscle differentiation which could explain the muscle fusion phenotype in the LM α 5 deficient intestine.

Conclusion: Our data suggest that conflicting signals arise in the embryonic intestinal tissue in the absence of the LM α 5 chain which presumably hamper proper signal integration at tissue level and thus cause an abnormal intestinal morphogenesis and embryonic lethality.

Key words: Laminin; Wnt and PI3Kinase signaling; intestinal pathologies; gene expression signature

Introduction

Development and homeostasis of the mammalian intestine is a complex morphogenetic process that requires sequential interactions between cells and the extracellular matrix (ECM). Inductive interactions between gut endoderm and the underlying mesenchyme pattern the developing digestive tract into regions with specific morphology and function. Specification into distinct regions involves transcription factors such as the Hox and caudal family of molecules.^{1,2} Cellular proliferation and differentiation in the intestine depends also on a multitude of different signals.^{2,3} In particular, the Wnt family of secreted growth factors plays a critical role in both normal development and tumorigenesis of the intestine.^{3,4}

ECM molecules and in particular BM components shape the sequential and reciprocal interaction between the epithelium and the mesenchyme. The BM contains a combination of permissive and inhibitory cues and is regulated in space and time. In the intestine, the laminin family of glycoproteins represents a major component of the BM found in the interface between endoderm and mesenchyme in the embryo and between epithelial cells and the underlying connective tissue in the adult tissue.^{5,6} Laminins regulate processes including cell adhesion, migration, angiogenesis, differentiation, tumor growth and metastasis.⁷ Laminins contain a single α -, β - and γ -chain that assemble into a cross-shaped trimer and form 16 different isoforms.⁸ Laminin-511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) is the prominent $\alpha 5$ -containing laminin isoform in the epithelial BM of developing and adult organs including intestine and is also found around individual smooth muscle cells.⁹⁻¹¹ The effects of laminins on cellular behavior depend on the receptors that participate in intracellular signaling, namely $\beta 1$ - and $\beta 4$ -integrins, the dystroglycan complex and the Lutheran-glycoprotein.⁸

A mouse lacking expression of the LM $\alpha 5$ gene is embryonic lethal (E17) which suggests an essential role of laminin-511 in embryonic development.¹² Knock-out embryos exhibit multiple tissue defects, including exencephaly, abnormalities in craniofacial anatomy, lung, kidney, tooth and hair follicle development as well as alterations in neural crest cell migration.¹²⁻¹⁷ In the intestine, we showed that the LM $\alpha 5$ chain plays a crucial role in the process of embryonic intestinal folding, in the development of the musculature and mucus epithelial cells.¹⁸ More recently, using a knock-out and transgenic-rescue strategy, Mahoney et al.¹⁹ showed that a reduced LM $\alpha 5$ expression and concomitant elevated expression of laminins $\alpha 1$ and $\alpha 4$ in the subepithelial BM of the small intestine was linked to transformation of the small intestine into a tissue resembling the colonic mucosa.

Our knowledge about the role of laminins in gastrointestinal pathologies is very limited. Alterations of laminin expression are detected in the small intestine of Crohn's disease patients which is accompanied by a reorganization of the crypt BM in the inflamed tissue.²⁰ In Hirschsprung disease, a developmental disorder that is associated with failure of enteric ganglia formation, an alteration in laminin expression among which the $\alpha 5$ chain was noted in both muscle layers and myenteric ganglia.²¹ An altered laminin expression was also observed in intestinal biopsies taken from children affected by intractable diarrhea called tufting enteropathy²² but to date it is unknown which laminin isoforms are affected.

Thus it is possible that laminin-511, the major $\alpha 5$ -containing laminin isoform of the intestine, is instrumental in activating signaling that is crucial in development, tissue homeostasis and human intestinal pathologies.

Little is known about the downstream targets of ECM components *in vivo*. Specific inactivation of BM molecules in mice combined with microarray analysis should help to investigate the intracellular signal transduction cascades activated upon contact of cells with a particular ECM molecule. The goal of our study was to elucidate how the LM α 5 chain containing laminins affect intestinal organogenesis and cell behavior. For this purpose we used the expression profiling technology to define signaling pathways that underlie cell adhesion to laminin-511 in its context of intestinal tissue organogenesis. We used a targeted LM α 5 knock-out mouse model and small *lama5* interfering RNAs. We showed that laminin-511 is essentially required for survival, epithelial morphogenesis and differentiation and linked signaling by laminin-511 to activation of PI3K/Akt and modulation of Wnt signaling.

Materials and Methods

Biological material and epithelial/mesenchymal intestinal dissociation

Snap-frozen bowel specimens from 6 children displaying tufting enteropathy and from 4 control children were obtained at the hospital Necker-Enfants Malades (Paris, France).^{22,23} Colon specimen from a patient with collagenous colitis was obtained at the Nice CHRU (France, Dr A. Rampal).

Embryos of *lama5*-deficient mice¹² were removed by caesarean section. For epithelial/mesenchymal dissociation, embryonic intestine of 13.5-day old mice are treated with a collagenase solution.²⁴ All experiments were performed in accordance with the INSERM institutional guidelines for animal care.

Generation of cDNA microarray and data analysis

The microarrays used for the transcriptome analysis contained 10,752 murine cDNA clones obtained from five different cDNA bank sources,²⁵ corresponding to 2150 genes. The preparation of fluorescent probes, hybridization step, scanning and quantitative image analysis are detailed in Supplementary Materials and Methods.

RNA interference

RNA interference for *lama5* was performed with siRNA sequence²⁶ and negative control siRNA (Eurogentec, Seraing, Belgium, 5'-CAGGACUGCCAGUAGACAdTdT). siRNA were transfected using INTERFERin (Polyplus-transfection, Illkirch, France) as described by the manufacturer. The plates were incubated at 37°C for 72h. Total RNA was purified and gene expression was measured by qRT-PCR (n=3).

Cell cultures; apoptosis, proliferation and migration assays

Immortalized mouse intestinal m-IC_{C12} cells²⁷, mesenchymal primary cultures from embryonic intestinal tissue derived from wild-type or LM α 5 deficient mice²⁸ and muscle-derived primary cell cultures were used. Cells were established and cultured as described in the Supplementary Materials and Methods section. Survival, proliferation and migration assays were done on m-IC_{C12} cells as described in Supplementary Materials and Methods.

Akt activity assay

After an overnight serum starvation, m-IC_{C12} and muscle-derived primary cells were plated on tissue culture dishes with or without laminin matrix as previously described.²⁹ Control of Akt activation was performed by adding EGF (0.02 μ g/ml; Sigma) and insulin (5 μ g/ml; Sigma) to the culture medium. In some experiments, wortmannin, a PI3K inhibitor, was added at a final

concentration of 1.5 μ M. Cell lysates were obtained as described in Turck et al.³⁰ Akt activity is also determined on homogenized intestinal tissue of LM α 5 deficient mice.

Plasmids, transfection experiments, and TCF/ β -catenin reporter assays

The TOPflash reporter vector was used to evaluate activity of Wnt signaling. HEK293 cells were plated into 24-well plates coated or not with either laminin-111, Caco-2 derived laminin-511 or recombinant human laminin-511 (BioLamina AB, Sweden). Luciferase assays were performed 24h later on cell lysates (Dual Luciferase Reporter assay system, Promega; Lumistar luminometer, BMG Labtech, Germany).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t* test. For migration studies, one way Anova test followed by Tukey's multiple comparison test served to verify significance of the observed differences.

Results

Expression of the LM α 5 chain is modified in human intestinal pathologies

In normal human intestine, the LM α 5 chain is found in both the subepithelial and the muscle BM.^{9,10} By immunodetection of the LM α 5, we and others had demonstrated some major modifications of the expression and localization of this chain in pathological tissue of the intestine.^{20,21} The normal gut mucosa displays a striking gradient of LM α 5 expression along the crypt villus axis with a high expression in the villus and low expression in the crypts.^{9,10} Examination of samples from the small intestine and colon of infants with tufting enteropathy, an epithelial dysplasia, or from collagenous colitis reveals a strong up-regulation of LM α 5 in the crypt region (**Figures 1A and B**). Such an altered expression of LM α 5 was also noted in Crohn's disease small intestinal mucosa (²⁰ and our unpublished data) but not in celiac intestinal mucosa.³¹ By staining with a Ki-67 antibody, we observed that the proliferating cell compartment accounts for nearly two thirds of the crypt which suggests that the crypt region had expanded in the intestinal mucosa of patients with tufting enteropathy (**Figure 1C**). The LM α 5 chain is also found in the adult human colon surrounding individual smooth muscle cells. Bowel tissue samples from Hirschsprung patients reveal an increase of LM α 5 immunostaining in the dilated muscle of the ganglionic bowel upstream the distal aganglionic region in a subgroup of patients.²¹

Together this increase of LM α 5 expression in human intestinal tissue with signs of pathologies point to an important role of this chain in intestinal physiology.

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

To address the role of the LM α 5 chain during organogenesis and cell interactions, a microarray analysis was performed. RNA was extracted from whole E-15.5 intestines of LM α 5-deficient and wildtype mice. Embryonic day 15.5 was chosen since at this time point villus morphogenesis is initiated,² and differentiation of smooth muscle and mucus cells is largely affected in the absence of the LM α 5 chain.¹⁸ Analysis of the RNA expression profiling revealed that 192 genes are upregulated and 164 genes are downregulated more than 2-fold in LM α 5 deficient intestine in comparison to wild-type tissue (**Supplementary Figure 1**). These differentially expressed genes were ordered according to their presumed functions (**Figure 2**). Amongst the upregulated genes, 27% of genes (51 genes) are involved in signal

transduction such as the Wnt and PI3K/Akt pathways. Moreover, 17% of genes (32 genes) encode molecules implied in gene transcription with some transcription factors relevant in epithelial as well as in mesenchymal tissue development and homeostasis. Furthermore, 4% of genes belong to the adhesion receptor family including three integrin subunits (α_v , α_M and β_4) and the 67kd laminin-111 receptor. Amongst the downregulated genes, again signaling molecules are the most affected (17%). 14% of genes (23 genes) are associated with epithelial or muscle cell differentiation (**Figure 2, Supplementary Table 2**).

Laminin-511 regulates expression of genes involved in cell adhesion and differentiation

Integrins and Lutheran are amongst the cell adhesion receptors that interact with LM α_5 -containing trimeric matrix molecules. Here we found that expression of the β_4 integrin is increased at mRNA (**Figure 2**) and protein level (**Supplementary Figure 2**). In contrast β_1 integrin expression is already low in controls and is slightly further decreased in the absence of *lama5* (**Supplementary Figure 2**). By tissue staining we saw that Lutheran is strongly decreased in the intestine as well as in the lung anlagen of LM α_5 deficient mice (**Supplementary Figure 2**).

Several genes encoding markers of epithelial differentiation are downregulated in the absence of the LM α_5 chain (**Figure 2**). These include molecules involved in lipid/cholesterol metabolism such as *Fabp1* and *Fabp2*, *ApoA1* and *ApoA4*, and *HmgCs2*. By semi-quantitative RT-PCR we confirmed a decrease of these transcripts in intestinal tissue from LM α_5 deficient mice in comparison to wildtype littermates (**Figure 3A**). The expression levels (1.5 to 3.1-fold decrease) are similar to those obtained by the microarray experiments. The absence of the LM α_5 chain also causes a reduced expression of genes encoding brush border enzymes such as the zinc metalloprotease *Mep1a* (*Meprin*) and the serine exopeptidase *DPP4* (**Figure 2**).

In accordance with the observation that the LM α_5 deficient intestine displays a smooth muscle defect,¹⁸ we find a repression of genes regulating the mesenchymal and muscle compartment. In particular gene products regulating gut motility such as *FHL1* (a regulator of muscle cell differentiation), *desmin* as well as *NPY* and *CCKAR* are significantly downregulated in LM α_5 deficient intestinal tissue (**Figure 2**). This was confirmed by RT-PCR for *FHL1*, *NPY* and *CCKAR* (**Figure 3B**) and correlates with the already described reduced protein levels of the muscle marker *desmin* in intestine lacking α_5 expression.¹⁸

Deregulated expression of Wnt signaling molecules in the LM α_5 deficient intestine

Expression of genes known to be expressed in the embryonic murine intestine such as *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt11*³² is LM α_5 chain-independent (not shown). But the absence of *lama5* had an impact on the expression of other Wnt pathway genes such as *axin1*, *Dvl2*, *Wnt 10b* that are downregulated. In contrast *Dvl1*, *Fzd2*, *sFRP2* are upregulated (**Figure 2**). Also expression of the Wnt target genes *Msx1*, *MyoD1* and *Pitx2* is upregulated 3.1-, 2.2- and 2.1-fold, respectively in intestinal tissue lacking *lama5* (**Figure 2**). By real-time RT-PCR we confirmed increased expression of *Pitx2* and *Sfrp2* in the α_5 knock-out intestine in comparison to the wild-type tissue (**Figure 4A**). By in situ hybridization we confirmed upregulation of the transcription factor *Msx1* in the endodermal compartment of the LM α_5 deficient intestine (**Figure 4B**). Upregulation of *MyoD1*, a classical muscle-specific transcription factor, was confirmed by immunostaining that revealed a *MyoD1*-positive signal in cultured intestinal mesenchymal cells derived from LM α_5 deficient embryonic intestines (**Figure 4B**). In addition *Hlx1*, implicated in epithelial-mesenchymal interactions, is also upregulated (**Figure 4A**).

Expression of *Hlx1*, *Pitx2* and *Sfrp2* was previously reported in the fetal intestine.³³ We confirmed and extended these findings. Expression was determined by qRT-PCR on RNA derived from physically separated embryonic intestinal endoderm and mesenchyme (**Figure 4C**). Although *Pitx2* is expressed in both tissue compartments, it is mostly an endodermal product. In contrast *Sfrp2* and *Hlx1* are predominantly or exclusively expressed in the mesenchymal compartment. In the absence of the LM α 5 chain, the ratio of gene expression between mesenchyme and endoderm did not change significantly.

Repression of *lama5* by siRNA phenocopies expression of target genes in *lama5* deficient intestinal tissue

To determine whether laminin-511 is necessary to regulate expression of the identified target genes, we used siRNA to downregulate *lama5* in wild-type embryonic mesenchymal cells and adult intestinal smooth muscle cells, which reached 60% and 68% repression in the embryonic and adult cells, respectively as shown by qRT-PCR (**Figure 4D a, c**) and immunofluorescence (**Figure 4D, b, d**). Analysis of *Hlx1* gene expression by qRT-PCR and of MyoD1 protein by immunofluorescence showed a 1.7-fold increase of *Hlx1* and the appearance of MyoD1-positive nuclei upon silencing of *lama5* in cells of embryonic and adult origin (**Figure 4D**).

Laminin-511 inhibits canonical Wnt signaling

To examine whether laminin-511 directly influences Wnt signaling we used the TOPflash reporter assay. As shown in **Figure 5**, on a laminin-511 substratum TCF-dependent reporter activity is repressed which is different to a laminin-111 coated surface where an activation is seen. Laminin-511 dependent inhibition of the TOPflash construct is also observed when cells were transfected with plasmids encoding TCF4 and stabilized β -catenin. These data suggest that cell adhesion to a laminin-511 substratum directly blocks Wnt signaling which may occur through a mechanism downstream of β -catenin stabilization.

Laminin-511 stimulates expression and activity of the survival factor Akt

Expression of genes belonging to the PI3K/Akt signaling pathway such as *Rasgrp2*, *Pik3cd*, *Pikc2g*, *Akt2* (**Figure 2**) is modified in the absence of the LM α 5 chain. Considering the central role of the serine-threonine protein kinase Akt in cell survival, we analysed regulation of this enzyme by laminin-511. Western blot analysis revealed that Akt protein expression and phosphorylation is lower in LM α 5 deficient intestines than in wild type controls (**Supplementary Figure 3A**). In control intestine, expression levels of Akt are higher in the mesenchyme than in the endoderm (**Supplementary Figure 3B**). In mesenchyme from the LM α 5 deficient intestine Akt expression is decreased, while this expression does essentially not change for the endoderm in comparison to control tissue (**Supplementary Figure 3C**). This result supports distinct roles of laminin-511 in the endoderm and the mesenchyme of the embryonic intestine.

To address the role of Akt, we investigated intestinal cell behavior in response to laminin-511 upon inhibition of PI3K which is upstream of Akt. Activation of Akt was examined in the m-IC_{C12} epithelial cell line and in intestinal muscle-derived primary cells that were seeded on laminin-511- or laminin-111-coated surfaces. As shown in **Figure 6A**, Akt is phosphorylated in m-IC_{C12} cells on laminin-511. But Akt lacks phosphorylation in cells on laminin-111. Addition of wortmannin, a specific inhibitor of PI3K, abolishes Akt phosphorylation in cells cultured on laminin-511 or upon stimulation with growth factors. In contrast to epithelial cells, laminin-511 does not stimulate Akt phosphorylation in muscle cells; yet, Akt can be

stimulated by EGF/insulin (**Figure 6B**). Phase contrast microscopy revealed that laminin-511 stimulates spreading of epithelial and muscle cells indistinguishably (**Figure 6A, B**). Inhibition of Akt with wortmannin abolished spreading of epithelial cells on laminin-511 as evidenced by cell rounding (**Figure 6A**). This is in contrast to muscle cells, which remain spread in the presence of wortmannin (**Figure 6B**). Altogether, our data provide evidence that laminin-511 specifically activates Akt through the PI3K pathway in intestinal epithelial but not in mesenchymal cells.

Interaction with laminin-511 protects against apoptosis, and activates proliferation and migration of intestinal epithelial cells

Since adhesion is important for survival³⁴ and laminin-511 supports adhesion of epithelial cells and Akt phosphorylation, we triggered apoptosis by H₂O₂ and investigated survival in the presence or absence of a laminin-511 substratum and upon treatment with wortmannin by using the MTS assay. We observed that the presence of laminin-511 protects cells against H₂O₂-induced apoptosis, where all cells survive, which is different to the absence of laminin-511 where 80% of cells died despite an indistinguishable cell adhesion on both substrata. Moreover, the apoptosis protecting effect of laminin-511 is completely abolished by wortmannin (**Figure 7A**).

Since we observed that genes involved in cell division such as cyclins, MAPKinases and cullins are deregulated in LM α 5 deficient intestinal tissue (see **Supplementary Table 2**), we investigated whether adhesion to laminin-511 potentially influences cell proliferation. m-IC_{C12} intestinal cells were seeded on laminin-511, incubated with BrdU and proliferating cells were detected with an anti-BrdU staining. Indeed, laminin-511 stimulates proliferation (**Figure 7B**).

Both laminin-511¹⁶ and PI3K³⁵ play a role in cell migration, therefore we determined whether laminin-511-specific migration is PI3K dependent. m-IC_{C12} epithelial cells were seeded at low density on laminin-511- or laminin-111-coated surfaces and motility was recorded by time-lapse video microscopy. We found that the migration speed is enhanced by laminin-511 as compared to laminin-111 (**Figure 7C**). Cell trajectories and immunodection of the cellular F-actin cytoskeleton are similar on both substrata (data not shown). But in contrast to cell survival laminin-511-dependent migration is not PI3K dependent, since wortmannin does not affect random migration (**Figure 7C**). To confirm this observation we used an independent assay where migration of m-IC_{C12} epithelial cells on laminin-511 was determined in the presence or absence of wortmannin. Here, migration is initiated upon changing the tilted position of the dish into a horizontal position. Again, cell migration is significantly increased on laminin-511 in comparison to cells seeded on an uncoated dish and this migration is not inhibited by wortmannin (**Figure 7D**). Our data show that laminin-511 triggers migration of intestinal epithelial cells in a PI3K independent manner.

Discussion

The prominent expression of laminin-511 in the gut suggests that this laminin plays an important role in intestinal tissue homeostasis. Indeed, as shown here and by others,^{18,20,21} uncontrolled overexpression in pathological intestinal tissue or lack of LM α 5 has a severe phenotype and clearly demonstrates that LM α 5 in the epithelial and muscle BM is essential for intestinal tissue morphogenesis. Gene ablation in the mouse reveals that LM α 5 is essential since LM α 5 deficient mice are early embryonic lethal.¹² Moreover the intestine of these mice is deranged and exhibits a muscle fusion phenotype.¹⁸ To understand the role of laminin-511

in intestinal homeostasis, we used RNA profiling of embryonic intestinal tissue of *lama5* knock out mice combined with cell culture experiments to determine the *lama5* specific gene expression signature in the developing intestine. To link the results to either the endoderm or the mesoderm we also separated both compartments and analyzed expression of candidates. Our data provide a mechanistic link between LM α 5 gene deficiency and the physiological phenotype. Two major results arise from the present study: loss of the LM α 5 chain alters the intestinal gene expression signature and LM α 5 is involved in regulating Wnt and PI3K signaling causing distinct cell responses in the endoderm and mesoderm.

During intestinal morphogenesis a subset of mesenchymal cells differentiate into smooth muscle cells. This differentiation is accompanied by morphological alterations of the cells such as elongation and alignment of mesenchymal cells, and expression of smooth muscle cell markers. In the absence of laminin-511 we observed an altered expression of mesoderm specific genes which are downregulated and indicate an abnormal differentiation and function. Moreover, metabolic enzymes of the intestinal epithelium as well as markers of the brush border are also downregulated in the absence of *lama5* again suggesting an aberrant differentiation.

Canonical Wnt signaling controls a variety of biological processes including embryonic patterning and colorectal cancer development. In the developing fetal intestine Wnt activity appears around E16 and in postmitotic cells³⁶. We found that several Wnt signaling target genes are induced in the absence of *lama5*, amongst them *Pitx2* and *Msx1* in the endoderm as well as *MyoD1* in the mesoderm. Activation of Wnt signaling in the absence of *lama5* suggests that Wnt signaling is repressed when *lama5* is expressed. Indeed our cell culture experiments provide evidence that a laminin-511 substratum represses canonical Wnt signaling. Wnt signaling potentially may promote proliferation and differentiation in the *lama5* deficient intestine. On the other hand several intestinal epithelial and mesodermal markers are downregulated (see **Figure 2**) which could explain that differentiation is incomplete and aberrant in both compartments. In the mesoderm the lack of *lama5* may have stimulated muscle differentiation which could provide an explanation for the muscle fusion phenotype observed in *lama5* deficient mice. It is intriguing to note that Wnt signaling had promoted survival and expansion of certain myoblast progenitor cells through *MyoD*.³⁷ The loss of LM α 5 is incompatible with life. An aberrant ectopic expression of LM α 5 is also deleterious as we have seen in tufting enteropathy and Hirschsprung disease that elevated LM α 5 is linked to increased proliferation and tissue expansion.^{21,22}

In the laminin-511 deficient intestine we observed an altered expression of matrix adhesion receptors. Whereas integrins α v, α M, β 4 and the 67kD laminin receptor are induced, expression of Lutheran is inhibited. It is conceivable that the newly expressed adhesion receptors as well as the lack of other receptors including Lutheran causes signaling that is profoundly distinct to that in a *lama5* expressing intestine and contributes to tissue disorganization.

We also showed that intestinal epithelial cells spread on laminin-511 which provides them with a PI3K dependent survival signal. This could be relevant in the developing intestine since loss of adhesion to an extracellular substratum causes anoikis, death due to homelessness.³⁴ Indeed, expression and activation of the PI3K downstream target Akt is strongly reduced in the intestine of *lama5* deficient mice. Enhanced adhesion and proliferation on laminin-511 has already been reported for keratinocytes, hematopoietic progenitor cells and human colon adenocarcinoma cells.²⁹ Now we demonstrate that laminin-

511 prevents apoptosis via a PI3K dependent pathway. Our data extend published observations made in lung cancer cells³⁸ by demonstrating an important role of laminin-511 in triggering survival of normal intestinal epithelial cells in a physiological setting. We also observed that intestinal epithelial cells migrate towards laminin-511, but this occurs in a PI3K-independent manner. The described role of laminin-511 in cell migration is in agreement with previously published data^{39,40} and may support its important role in metastasis.⁴¹

We conclude that conflicting signals are elicited in the absence of *lama5*, that alter adhesion and migration, induce differentiation and finally trigger anoikis. Integration at tissue level may cause abnormal intestinal tissue morphogenesis. What do we learn about the physiological role of *lama5* from these experiments? We demonstrated that cell responses toward a laminin-511 and laminin-111 substratum are clearly distinct. A laminin-511 substratum prevents chemical-induced apoptosis whereas a laminin-111 substratum does not. On the contrary, a laminin-111 substratum induces Wnt signaling whereas a laminin-511 substratum represses Wnt signaling. These data suggest distinct functions of each of the two laminins which is further supported by data from knock out mice. In contrast to the *lama5* deficient mice, SOX2-Cre-mediated knock out of *lama1* in the embryo proper does not interfere with viability⁴² or normal morphogenesis of the intestine (Lefebvre et al., unpublished data). Thus integration of signaling responses toward laminin-511 and laminin-111 may be crucial for the normal development of the intestine. Moreover, it is conceivable that uncontrolled expression of either or both of the laminins leads to pathologies of the intestine.

Acknowledgements

The authors thank members of the Department of Pediatric Gastroenterology-Hepatology and Nutrition (Hopital Necker-Enfants Malades, Paris), Drs Miner, Vandewalle, Sorokin, Engvall, Kennel, Le Van Kim, Hauri and Clevers for providing mice, cells, antibodies or vectors. We thank A. Klein and C. Arnold for their expert technical assistance.

References

1. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16:588-599.
2. McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2009;136:2074-2091.
3. Verzi MP, Shivdasani RA. Wnt signaling in gut organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:87-91.
4. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology* 2009;71:241-260.
5. Teller IC, Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-18.
6. Simon-Assmann P, Bolcato-Bellemin AL, Turck N, Piccinni S, Olsen J, Launay JF, Lefebvre O, Kedinger M. Basement membrane laminins in normal and pathological intestine. In: Johnstone P, ed. *Disease Progression and Carcinogenesis in the Gastrointestinal Tract*. London: Kluwer Academic Publishers, 2003:223-239.
7. Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:255-284.
8. Durbeek M. Laminins. *Cell Tissue Res* 2010;339:259-268.
9. Beaulieu JF, Vachon PH. Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* 1994;106:829-839.
10. Simon-Assmann P, Duclos B, Orian-Rousseau V, et al. Differential expression of laminin isoforms and alpha 6- beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* 1994;201:71-85.
11. Lefebvre O, Sorokin L, Kedinger M, et al. Developmental expression and cellular origin of the laminin α 2, α 4, and α 5 chains in the intestine. *Dev Biol* 1999;210:135-150.
12. Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for laminin in embryogenesis: Exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha 5 chain. *J Cell Biol* 1998;143:1713-1723.
13. Miner JH, Li C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin α 5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol* 2000;217:278-289.
14. Nguyen NM, Miner JH, Pierce RA, et al. Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Dev Biol* 2002;246:231-244.
15. Li J, Tzu J, Chen Y, et al. Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J* 2003;22:2400-2410.

16. Coles EG, Gammill LS, Miner JH, et al. Abnormalities in neural crest cell migration in laminin [alpha]5 mutant mice. *Dev Biol* 2006;289:218-228.
17. Fukumoto S, Miner JH, Ida H, et al. Laminin (alpha)5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem* 2006;281:5008-5016.
18. Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, et al. Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 2003;260:376-390.
19. Mahoney ZX, Stappenbeck TS, Miner JH. Laminin (alpha)5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J Cell Sci* 2008;121:2493-2502.
20. Bouatrouss Y, Herring-Gillam FE, Gosselin J, et al. Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* 2000;156:45-50.
21. Alpy F, Ritie L, Jaubert F, et al. The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation. *Hum Pathol* 2005;36:1055-1065.
22. Goulet O, Kedinger M, Brousse N, et al. Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J Pediatr* 1995;127:212-219.
23. Patey N, Scoazec JY, Cuenod-Jabri B, et al. Distribution of cell adhesion molecules in infants with intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Gastroenterology* 1997;113:833-843.
24. Simon-Assmann P, Bolcato-Bellemin AL, Klein A, et al. Tissues recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. *Methods Mol Biol* 2009;522:309-318.
25. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "Zonation-Keeper" of mouse liver. *Developmental Cell* 2006;10:759-770.
26. Rebutini IT, Patel VN, Stewart JS, et al. Laminin [alpha]5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through [beta]1 integrin signaling. *Developmental biology* 2007;308:15-29.
27. Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, et al. Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICcl2) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol -Cell Physiol* 1996;39:C1666-C1674.
28. Olsen J, Lefebvre O, Fritsch C, et al. 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* 2000;347:407-417.
29. Turck N, Gross I, Gendry P, et al. Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2005;303:494-503.

30. Turck N, Richert S, Gendry P, et al. Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells. *Proteomics* 2004;4:93-105.
31. Korhonen M, Ormio M, Burgeson RE, et al. Unaltered distribution of laminins, fibronectin, and tenascin in celiac intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1011-1020.
32. Lickert H, Kispert A, Kutsch S, et al. Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mechanisms of Development* 2001;105:181-184.
33. Stegmann A, Hansen M, Wang Y, et al. Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol Genomics* 2006;27:141-155.
34. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ* 2005;12:1473-1477.
35. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003;63:2172-2178.
36. Kim BM, Mao J, Taketo MM, et al. Phases of canonical Wnt signaling during the development of mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2007;133:529-538.
37. Cossu G, Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J* 1999;18:6867-6872.
38. Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, et al. 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* 2002;277:19922-19928.
39. Pouliot N, Nice EC, Burgess AW. 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* 2001;266:1-10.
40. Gu J, Nishiuchi R, Sekiguchi K. Matrix metalloproteinase-2 is involved in A549 cell migration on laminin-10/11. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;296:73-77.
41. Chia J, Kusuma N, Anderson R, et al. Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am J Pathol* 2007;170:2135-2148.
42. Edwards MM, Mammadova-Bach E, Alpy F, et al. Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem* 2010;285:7697-7711.

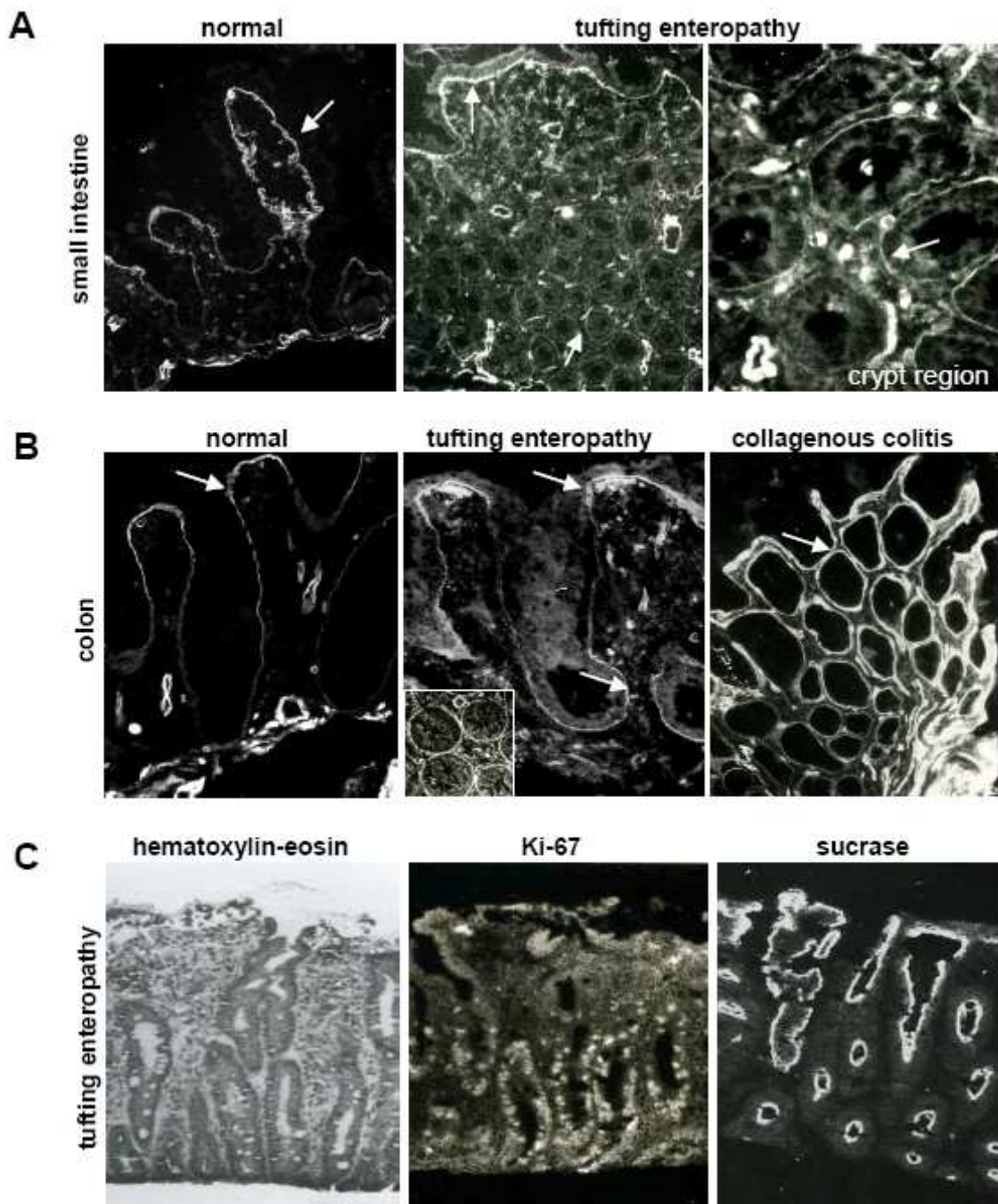
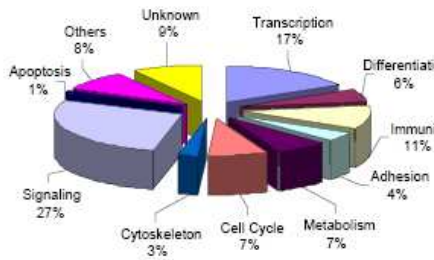


Figure 1: Deregulated LM α 5 expression in the intestine of patients with tufting enteropathy and collagenous colitis

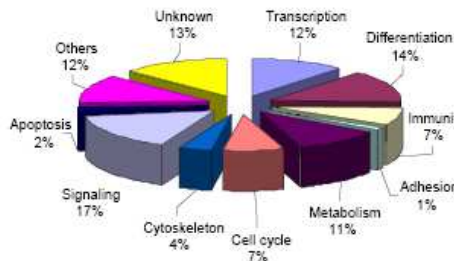
LM α 5 detection on small intestine (A) and colon (B) from patients with tufting enteropathy and collagenous colitis reveal a differential location of this chain as compared to controls. While α 5 is detected mostly at the villus compartment in control specimen, it is found also in the crypt region (inset) in tufting enteropathy specimen. In a specimen of collagenous colitis, the staining is stronger all over the crypt-villus axis. Arrows point to the BM region. (C) Examination of small intestine of a patient with tufting enteropathy shows an extended location of dividing cells and yet a normal cell differentiation (sucrase-isomaltase staining).

A Upregulated genes in absence of *lama5*



Accession number (UniGene NCBI)	Gene	Stimulation	Description/main functions
Transcription factors			
<i>mesenchymal</i>			
Mm.1347	Hlx1	2.3	homeobox gene, cell interaction
Mm.4509	Rumx2	2.2	metallopeptase induction, anti-proliferative
Mm.103615	Hey1	2.4	bHLH factor, muscle expression, differentiation
<i>epithelial and mesenchymal</i>			
Mm.2334	Smad2	2.1	TGF β 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_4 integrin	2.2	fibronectin/vitronectin receptor
Mm.4967	α_4 integrin	2.0	ICAM receptor
Mm.21117	β_4 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/agonist
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 in absence of *lama5*



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 upregulated and downregulated genes in absence of *lama5*

The 192 upregulated and the 164 downregulated genes were grouped according to their presumed function. Brief description and main functions of deregulated genes in *lama5* knock-out intestines are given as well as the rate of stimulation or repression.

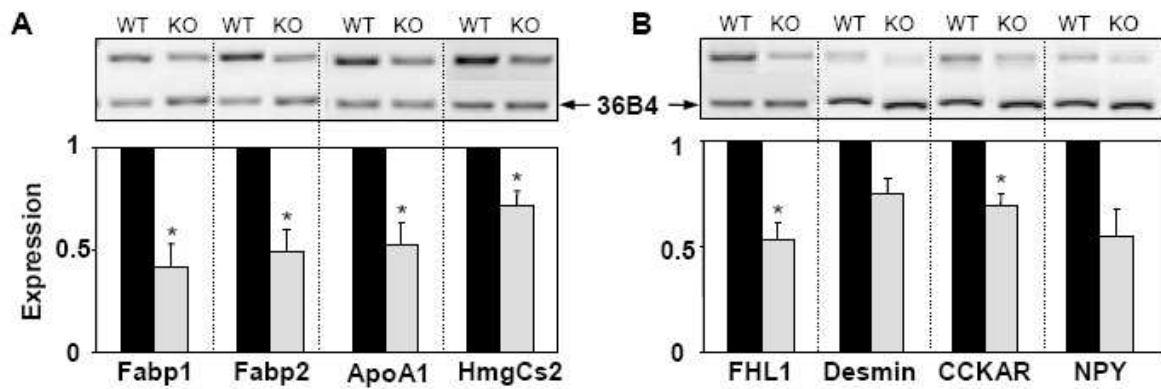


Figure 3: Validation of candidate genes involved in differentiation

Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed on E15.5 control (WT) and knock-out (KO) intestines for genes belonging to the epithelial (A) or muscle (B) compartment ($n \geq 3$). Data are presented as fold changes between knock-out (grey bars) and wild-type (black bars) (mean \pm SEM, $n = 3$ to $n = 9$) (* $p < 0.05$).

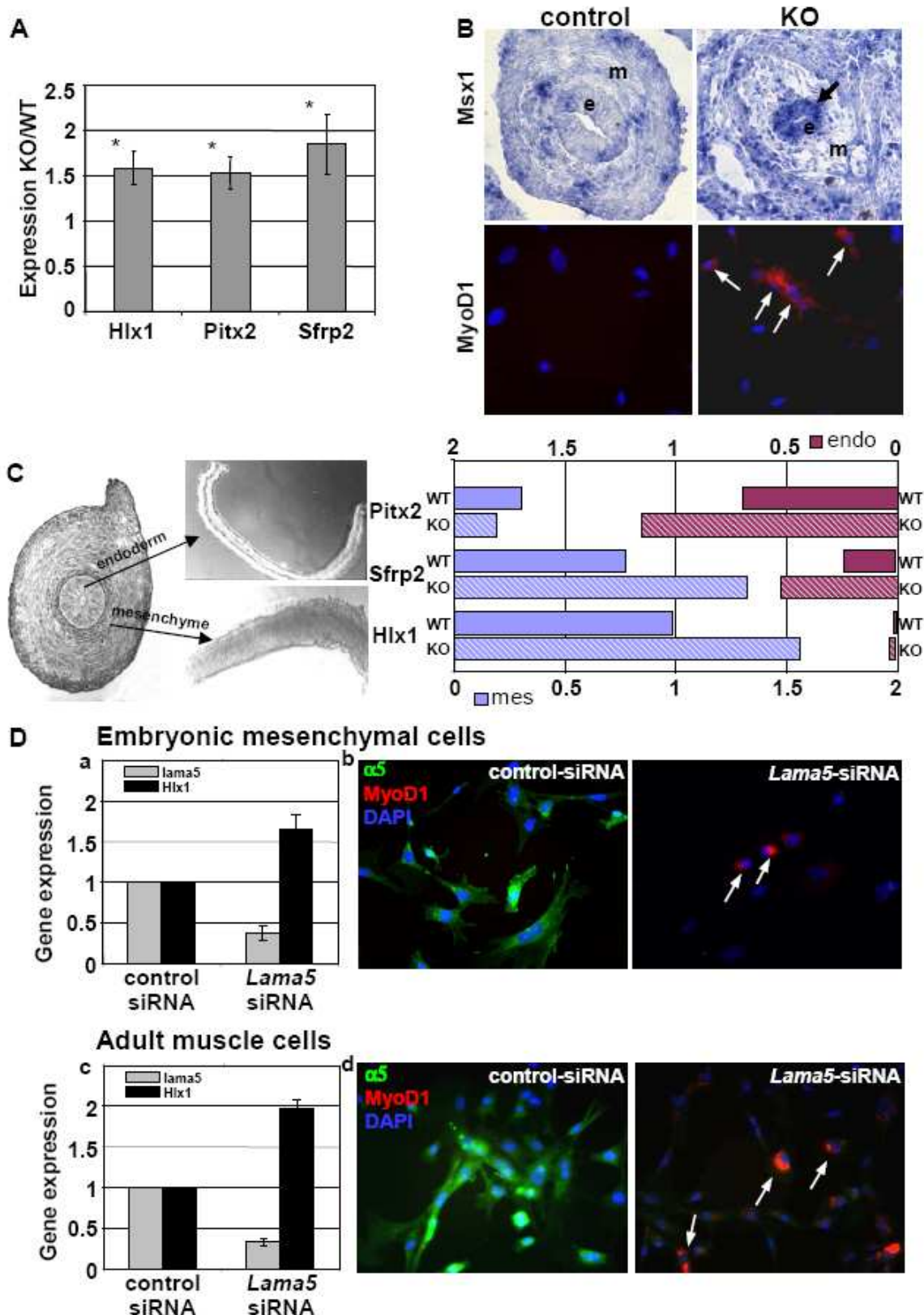


Figure 4: Expression of genes involved in Wnt-signaling in $LM\alpha 5^{-/-}$ intestinal tissue
 (A) Gene expression rates of Hlx1, Pitx2 and Sfrp2 between intestinal E15.5 knock-out and control RNA (mean \pm SEM, $n=7-9$; $*p < 0.02$). (B) *In situ* hybridization of Msx1 and immunostaining of MyoD1 (red) on embryonic control and KO intestines or on cultured-derived mesenchymal cells. Msx1 is stimulated and MyoD1 induced in knock-out endodermal and mesenchymal cells respectively (arrows); e: endoderm; m: mesenchyme. (C) Quantitative

RT-PCR were performed on isolated compartments. Diagrams show the relative expression of genes between mesenchyme (mes) and endoderm (endo) with value 1 being the total amount in control intestines. The relative proportion of the genes between the mesenchymal and endodermal compartment are not altered in $LM\alpha 5^{-/-}$ intestines. (D) Effects of siRNA to *lama5* on mesenchyme-derived target genes, *Hlx1* and *MyoD1*. Embryonic mesenchymal cells and adult intestinal smooth cells were cultured in the presence of control- and *lama5*-siRNA. *Lama5*-siRNA decreases $LM\alpha 5$ gene (up to 68%) and protein expression (in green) in both embryonic and adult cells. *Lama5*-siRNA upregulates *Hlx1* gene expression and *MyoD* protein expression (in red). After 72 h, gene expression was analyzed by RT-Q-PCR normalizing to GAPDH and expressed as relative fold-change (mean \pm SEM) compared to control-siRNA. Arrows point to *MyoD* positive cells. Nuclei are stained with DAPI (blue).

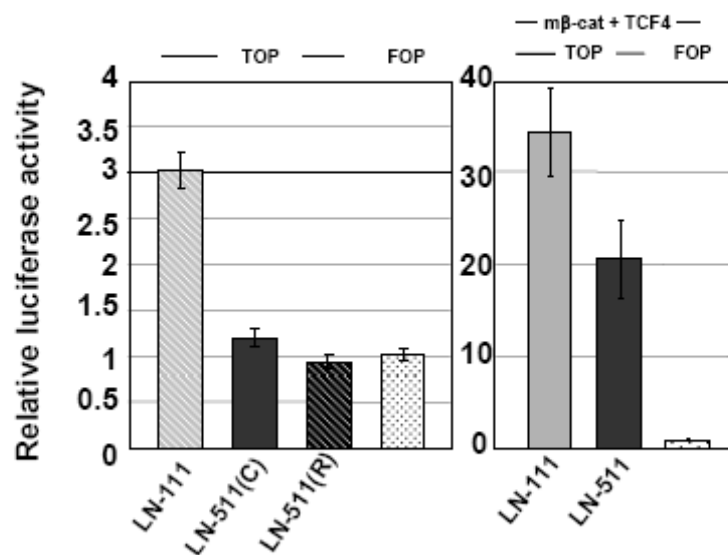


Figure 5: Presence of laminin-511 inhibits TOPflash activity

HEK293 cells seeded on laminin-111, cell-derived laminin-511(C) or on recombinant laminin-511(R) were transfected with TOPflash, a β -catenin/TCF/LEF-responsive luciferase reporter plasmid, or the negative FOPflash vector. Control experiments consist of TOPflash or FOPflash transfected cells with plasmids encoding TCF4 and mutated/active β -catenin. The graphs represent the average relative luciferase activity normalized to luciferase Renilla activity ($n \geq 3$ except for laminin-511(R) $n=1$; in duplicate; mean \pm SEM). Note that the TOPflash activity is inhibited when cells are grown on laminin-511.

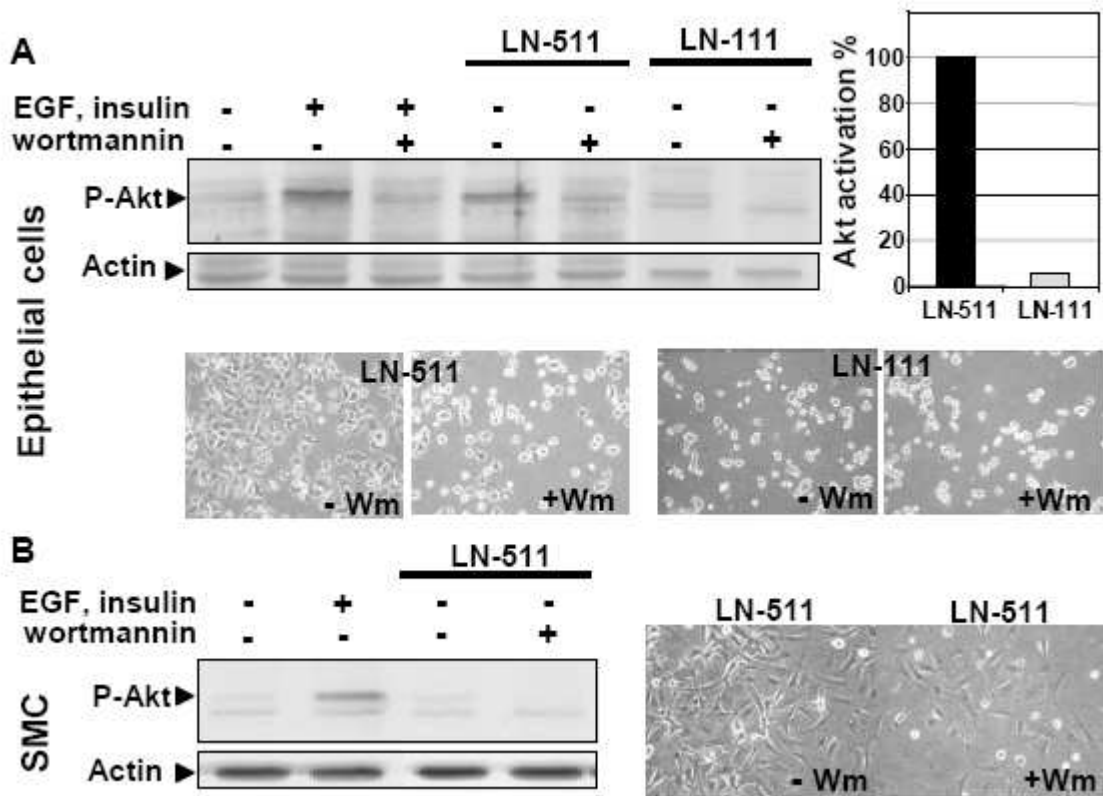


Figure 6: Activation of Akt in epithelial cells adhering to laminin-511

m-IC₁₂ epithelial cells (A) and embryonic smooth muscle cells (SMC; B) were plated on uncoated dishes +/- EGF and insulin, and on dishes containing laminin-511 or laminin-111. The PI3K inhibitor wortmannin was added where indicated. Cell lysates were analyzed for phosphorylated Akt (P-Akt) and actin after blotting. Note that activation of Akt is visible in epithelial cells cultured on laminin-511 but not on laminin-111; no activation occurred in muscle cells in the presence of laminin-511.

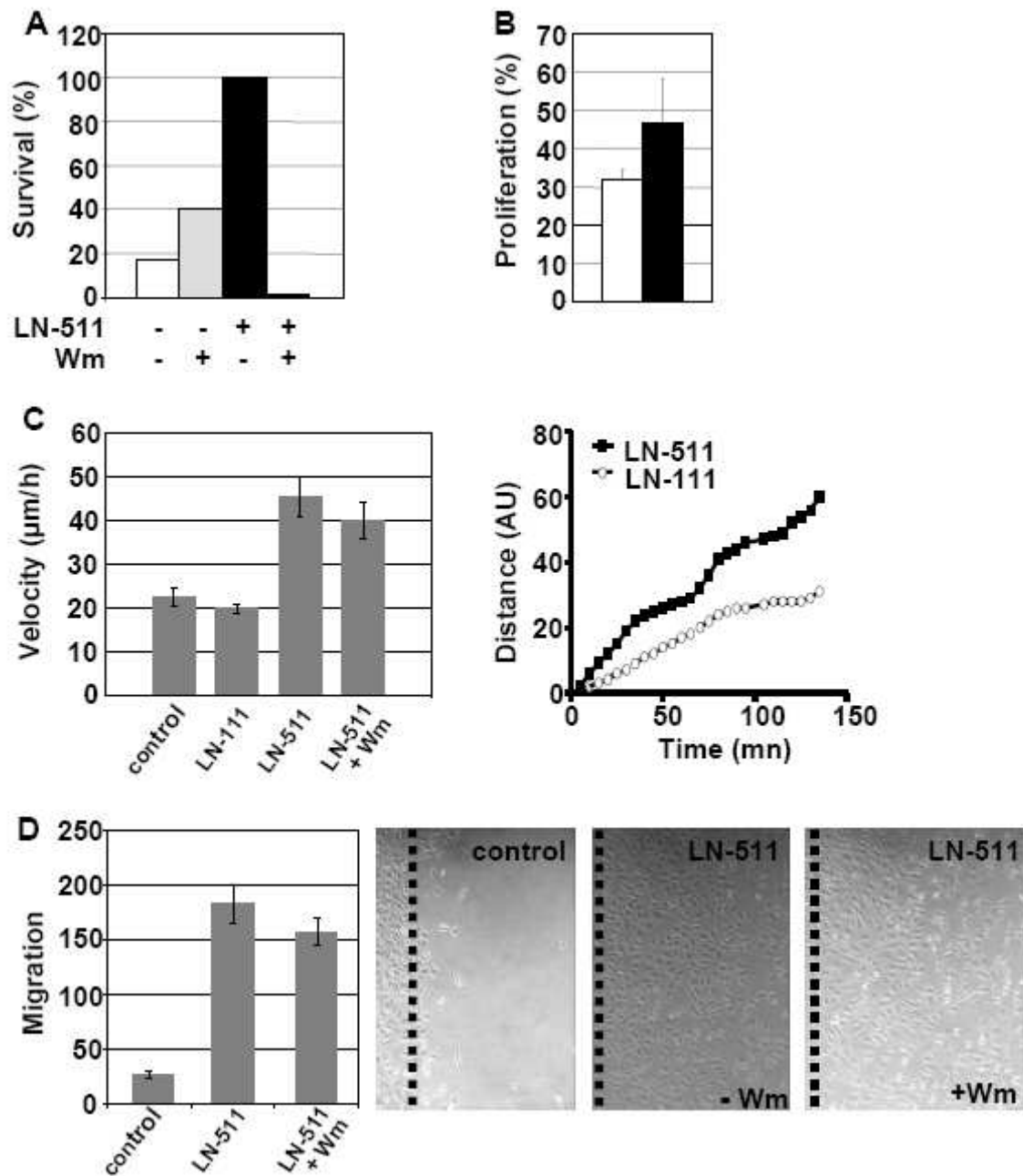
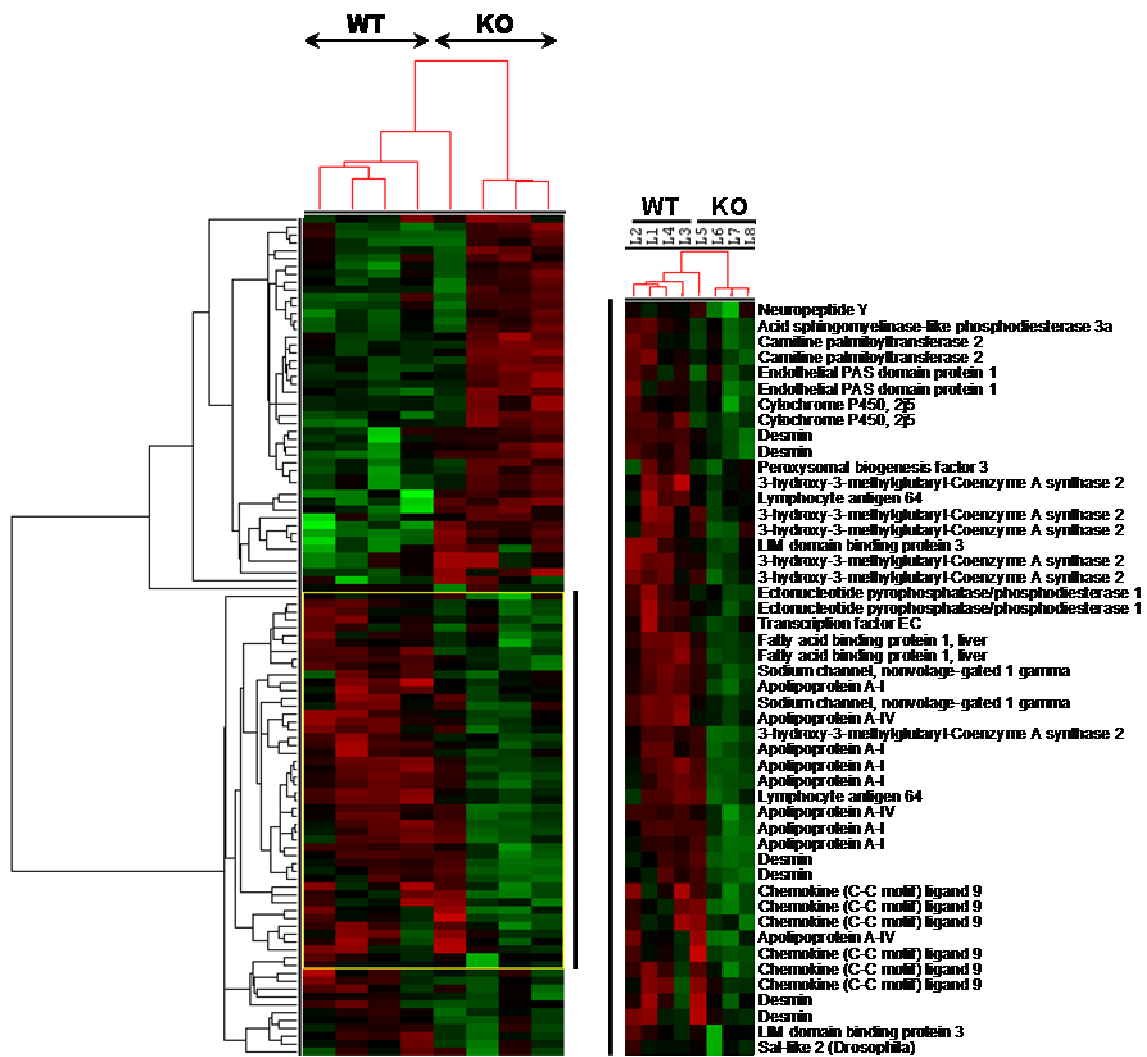


Figure 7: Laminin-511 controls epithelial cell survival, proliferation, and migration

(A) In a survival assay, m-IC_{C12} intestinal cells were seeded on laminin-511 coated or on uncoated dishes with H₂O₂ +/- wortmannin (Wm). The anti-apoptotic effect of laminin-511 is dependent on PI3K as assessed by the absence of living cells on laminin-511 with wortmannin. (B) Proliferation of m-IC_{C12} cells is activated on laminin-511 (black) compared to control (white). (C) Both migration velocity and cumulative migrated distance of cells are enhanced when seeded on laminin-511 versus laminin-111. (D) Chemotactic migration assay of m-IC_{C12} cells on uncoated dishes and on laminin-511 +/- Wm shows that laminin-511 stimulated cell migration independently of the PI3K/Akt pathway (mean +/- SEM).

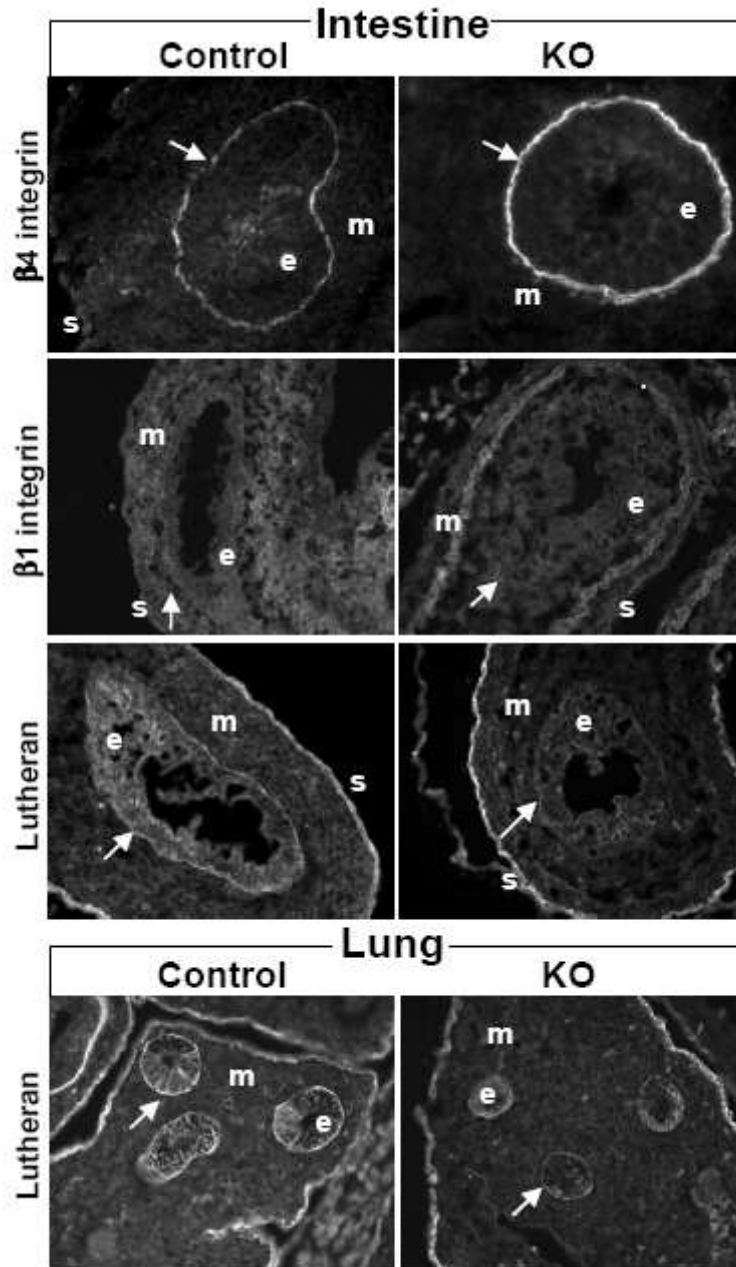
Supplementary Table 1: Sequences of the primers used for RT-PCR or RT-QPCR

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
GAPDH	TaqMan mouse endogenous control (Applied Biosystems)
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
Lama5	GGCCAGGAAGAACCAGCTA
	GCAATCTTCTCACTGGTCTCG
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 Gene ID 22410

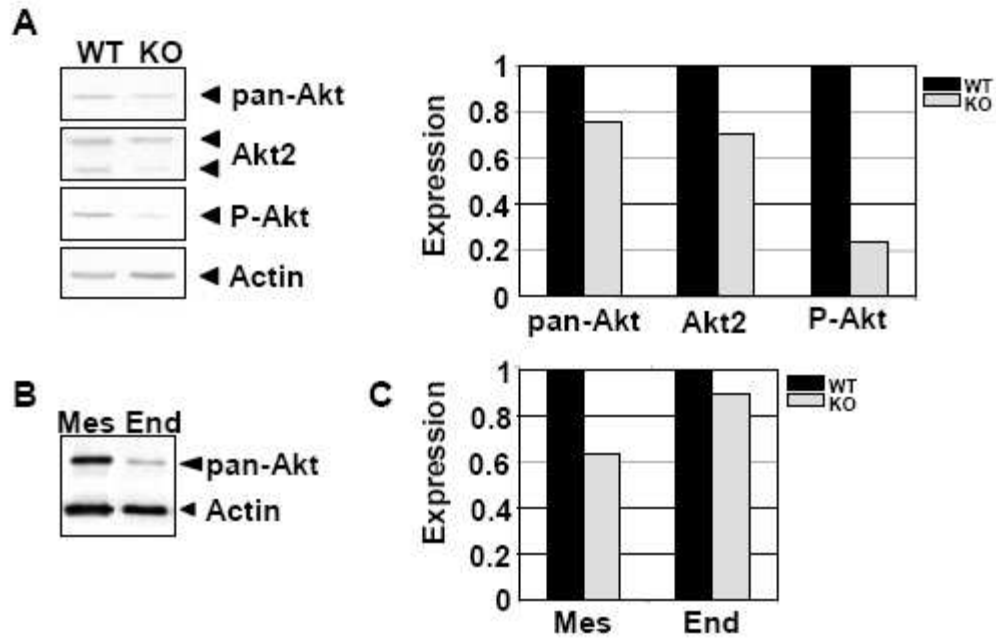


Supplementary Figure 1: Laminin $\alpha 5$ -specific gene clusters in intestinal tissue

Selected clusters produced by a hierarchical clustering program are shown on the left. The top clusters follow a pattern of increased expression in laminin $\alpha 5$ $-/-$ intestines. In the bottom, clusters of genes are shown whose expression is reduced in knock out intestine (KO) as compared to wild type intestine (WT). Since the severity of the phenotype was heterogenous between samples a similar change in expression in at least 2 of 4 independent experiments with at least a two-fold difference in expression between normal and laminin $\alpha 5$ deficient intestinal tissue was used as criteria. 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 a decreased expression in the knock out and with the listing of the corresponding genes. Each column represents a single experiment, and each row represents a single gene. Increased expression is displayed in red, repressed expression is shown in green and unchanged expression in black, with the relative \log_2 (ratio) reflecting the intensity of expression. The co-hybridization strategy used in our cDNA microarray experiments controls array variations through data normalization with a common reference, thereby generating data that can be compared between multiple samples. Similar results were obtained from samples derived from independent litters. Note that the controls (WT, L1 to L4) appear as a separate group distinct from the knock out group (KO, L5 to L8).



Supplementary Figure 2: Immunodetection of integrin $\beta 4$ and $\beta 1$ subunits, and of Lutheran in control and laminin $\alpha 5$ knock-out embryonic intestinal and lung tissue
 Basal staining of the $\beta 4$ subunit was increased concomitant to the lack of laminin $\alpha 5$ chain in the intestine (arrows); at the opposite epithelial Lutheran immunoreactivity was strikingly decreased in both intestine and lung. e, endoderm, m, mesenchyme; s, serosal layer; arrows point to the subepithelial basement membrane region.



Supplementary Figure 3: Expression of total and active Akt is decreased in laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines

(A) Representative immunoblots showing the expression of Akt (pan-Akt), Akt2 and Phospho-Akt (pan P-Akt) in E 15.5 control (WT) and knock-out (KO) intestines. Average of two experiments was quantified and is expressed as ratio between knock-out (grey bars) versus wild-type controls (black bars). Data were normalized using actin. (B) Representative immunoblot showing that Akt is mainly expressed in the E 13.5 intestinal mesenchyme (Mes) as compared to endoderm with little Akt (Endo). (C) The graphs representing expression rates between pan-Akt and actin show that the decrease in Akt expression in laminin $\alpha 5^{-/-}$ (KO: grey columns) compared to control (WT: black columns) intestines is mainly due to a loss of expression in the mesenchymal compartment.

Supplementary Materials and Methods

Tissue staining, visualisation of proliferation and sucrase-isomaltase on human tissues

Biopsies were fixed in Bouin solution and stained with hematoxylin-eosin reagent. Immunodetection of dividing cells was done as previously described using anti-human Ki-67 (Dako, France) antibody.¹ Brush-border sucrase-isomaltase was detected with monoclonal antibodies kindly provided by Dr HP Hauri.¹

RNA extraction

Samples were immediately stored in RNA Later (Ambion, Courtaboeuf, France). RNA was extracted using Tri Reagent (Molecular Research Center Inc., Euromedex, France) and further purified by an additional phenol/chloroform 5/1 (V/V) extraction. The integrity and purity of each RNA sample was checked by microcapillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Massy, France).

cDNA microarray preparation and data analysis

Generation of the cDNA microarray was done according to Ghate et al.² The microarray experiments were performed in quadruple with independently prepared RNA from mutant and wild-type embryonic intestines at embryonic day 15.5 derived from 4 different litters. For each RNA sample, a dye-swap labeling and hybridization was performed using a common reference RNA sample corresponding to 15.5-day embryonic intestine of C57B1/6J mice. Cy3- and Cy5- labeled cDNA probes were prepared by reverse transcription, using SuperScriptII from Gibco-BRL (Invitrogen Cell Culture, France). They were then mixed together, purified and concentrated using the Microcon YM-30 filter (Millipore; Molsheim, France), and finally resuspended in hybridization solution: 50 % formamide, 4X SSC, 0.6 % SDS, 5X Denhardt solution, 0.25 mg/ml of mouse Cot-1 DNA, 1mg/ml salmon sperm DNA and 1mg/ml poly(dA).

The slides were immersed in a prehybridization solution (50 % formamide, 4X SSC, 0.1 % SDS, 0.1 % BSA fraction V) for 30 min at 46° C before probe hybridization in a humid chamber overnight at 46° C. Prior scanning, three posthybridization washes were performed. Array scanning and data analysis was done as described in Ghate et al.²

The Gene Cluster 3.0 and Java Treeview 0.9.6 programs were used for analyzing microarray data. The normalized ratio of RNA sample (control or mutant) to reference RNA (log₂) was calculated, and this ratio was directly used for the comparison of gene expression in the different samples.

Semi-quantitative and quantitative RT-PCR

At least 3 paired intestinal control and knock-out samples taken from distinct litters were used. Primer sequences are described in **Supplementary Table 1**. Total RNA was treated with DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France). cDNA synthesis was done according to Turck et al.,³ or by using the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems Inc, France). Semi-quantitative PCR were performed with the Red'y Star Mix 2X (Eurogentec, Seraing, Belgium) using an iCycler apparatus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Control PCR was performed directly on RNA without reverse transcription. PCR fragments were analyzed by 3% (w/v) agarose gel electrophoresis using the gel Doc 1000 apparatus (Bio-Rad). The 36B4 ribosomal gene served as a standard for sample normalization.

For quantitative real-time PCR analysis, we used the LightCycler™ system (Roche Diagnostics, Meylan, France) or the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems Inc, France). PCR amplification was performed using the FastStart DNA Master Mix SYBR

Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France) or using the TaqMan® Gene Expression Master mix for GAPDH or the *Power SYBR®* Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc, France). PCR efficiency (E) determined by serial dilution of a pool of cDNA was calculated by the slope of the regression line ($E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$) and was higher than 80%. The specificity of the PCR products was assessed by generating a melting curve. The comparative CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method) was used to quantify the cDNA of interest relative to the PBGD (porphobilinogen desaminase) or the GAPDH references. Data are represented as ratios of mean values (+/- SEM).

RNA in situ hybridization

In situ hybridization of *Msx1*-labeled probe on frozen sections of E14.5 mouse embryos was performed as described in Gradwohl et al.⁴ The *Msx-1* antisense RNA probe (probe provided by Dr R. Hill, MRC Human Genetics Unit, Edinburgh, UK) was synthesized from a 880pb cDNA inserted in a pTZ19 vector.

Cell culture

Immortalized mouse intestinal m-IC_{C12} cells⁵ were maintained in culture at 37° C in DMEM/Ham F12 medium (Invitrogen Cell Culture, France) supplemented with 2.4 g/l D-glucose (Sigma), 5 µg/ml transferrin (Sigma), 50nM dexamethasone (Sigma), 5 µg/ml insulin (Sigma), 30 nM sodium selenite (Sigma), 1 nM triiodothyronine (Sigma), 10 ng/ml epidermal growth factor, 2% fetal calf serum and 1 % peni-streptomycin. Mesenchymal primary cultures used until the third passage were established from embryonic intestinal tissue derived from wild-type or laminin $\alpha 5$ deficient mice after collagenase treatment as described previously.⁶ Muscle-derived primary cell cultures were obtained from adult small intestine as follows: the outer muscle layer was removed, minced with scissors and then incubated in a collagenase/trypsin solution (collagenase XI, Sigma, 300 U/ml; trypsin, Calbiochem, 0.1 mg/ml in RPMI medium) for 1 hour at 37° C under shaking. After centrifugation the cells were transferred to collagen-I coated dishes in RPMI medium (Invitrogen Cell Culture, France) supplemented with 10% fetal calf serum and gentamycin. These primary muscle cells were used until the 5th passage. The human embryonic cell line HEK293 was maintained in DMEM medium (Invitrogen Cell Culture, France) supplemented with 10% fetal calf serum and gentamycin.

Western blot analysis

The western blot procedure is performed using standard protocol and is described in Turck et al.⁷ The following antibodies were used: rabbit polyclonal antibodies against Akt (9272, Cell Signaling; 1:1000), Akt2 (1:500; kindly provided by Dr B.A Hemmings, Friedrich Miescher Institute, Basel; Yang et al. 2003), rabbit monoclonal antibodies to PTEN (138G6, Cell Signaling; 1:1000), mouse monoclonal antibodies against Phospho-Akt (4051, Ser473, Cell Signaling; 1:1000), actin (Mab 1501R, Chemicon; 1:15,000). After incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse alkaline phosphatase-linked secondary antibodies, the blots were developed using ECL (enhanced chemiluminescence substrate, Amersham Life Science Ltd, Buckinghamshire, England). Signals were quantified by using the Quantity One software (BioRad, CA, USA). The MagicMark Western Standard (Invitrogen, Cergy Pointoise, France) was used as molecular weight marker.

Detection of apoptosis, proliferation and migration assays

For survival assays, mouse m-IC_{C12} intestinal cells were cultured on uncoated dishes overnight in serum-free medium. After trypsinization, cells were allowed to attach on uncoated or laminin-511 coated dishes (15×10^4 cells/ 0.7 cm²) for 6 h prior to 1 hour-treatment with 200

μM H_2O_2 in DMEM/HamF12 serum-deprived medium with or without $1.5\mu\text{M}$ wortmannin. Surviving cells were detected after 24 h with MTS (CellTiter 96^R AQueous One solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, WI) as previously described.⁸ Data are presented as percentage of recovered cells in absence of H_2O_2 . Alternatively, cells undergoing apoptosis were detected by immunostaining of cleaved caspase-3 using rabbit polyclonal antibodies (RD Systems; diluted at 1:500). Four independent experiments were performed in duplicate.

For proliferation assays, mouse m-IC_{C12} intestinal cells were seeded at 15×10^4 cells/ 0.7 cm^2 chamber (Lab-Tek Permanox Chamber Slide, Nunc) on uncoated or on laminin-511-coated dishes for 24 h prior the 1h-incubation with BrdU ($10\mu\text{M}$; Sigma-Aldrich). Cells were then fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min and then treated with 2M HCl for 60 min at 37°C to denature DNA. After washing, anti-BrdU-fluorescein (Roche, IN, USA; 1:10) was added. The number of BrdU-positive cells was counted in randomly fields using an epifluorescence microscope (AX 60, Olympus Optical Co, Hamburg, Germany). Total number of cells was determined by DAPI staining (Sigma-Aldrich). Quantification of the proliferative cells was performed by counting BrdU positive cells, reported as a percentage of total cells present on the dish (visualized by DAPI nuclear staining). Three independent experiments were performed (with 4 to 6 replicates/experiment, mean \pm SEM).

Two types of cell migration assays were used. To assess the directed migration 2.5×10^5 cells/ 9.6 cm^2 were plated on uncoated or laminin-511 coated dishes, immediately fixed in a 20 degree upright angle for 3 h before the dishes were horizontally placed to start the migration assay. The cell front was marked before and after the experiment at 24h. Each experiment was performed in duplicates. In order to follow the random (chemokinetic) migration of the cells, time-lapse sequence videomicroscopy was used. 2.5×10^5 cells/ cm^2 were grown on plastic, laminin-111, laminin-511 enriched matrix or laminin-511 plus wortmannin (final concentration of $1.5\mu\text{M}$) for up to 48h. Cultures were maintained at 37°C , 5% CO_2 in the humidified chamber of the inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) equipped with a digital camera (Coolsnap fx, Roper Scientific). Images were taken every 10 minutes and movies were reconstructed using the Metaview software (Universal Imaging). Migration velocity was determined for at least 20 cells on all different substrata. Results are presented as the averaged velocity expressed in $\mu\text{m}/\text{h}$. Cumulative migrated distance was determined for individual cells and compared for the different substrata. At the end point of the experiment, cells were fixed (in 4% paraformaldehyde for 30 mn), and stained with Phalloidin-FITC (Sigma P5282; 1/100) and DAPI. In both assays, mitomycin C (Sigma, $5\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to block cell proliferation.

Plasmids, transfection experiments, and TCF/ β -catenin reporter assays

Cells were transfected with the TOPflash vector, a β -catenin/TCF/LEF-responsive Firefly luciferase reporter plasmid along with the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-null vector, Promega, France) used as an internal transfection control. Positive controls consisted of cells co-transfected with the TOPflash plasmid along with expression plasmids encoding TCF4 and mutated active β -catenin. The FOPflash vector in which the TCF-responsive elements are mutated was used as a negative control. Transfections were performed 24h after plating using JetPEITM reagent (Polyplus-Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Luciferase firefly activity was normalized to luciferase Renilla activity.

Immunofluorescence

For indirect immunofluorescence, human or dissected mouse intestines were embedded in Tissue-Tek (Sakura, Labonord) and frozen on dry ice. Immunodetection of laminin $\alpha 5$ chain was performed on cryosections of human samples with the mouse monoclonal 4C7 antibodies

(hybridoma obtained from Dr E. Engvall, The Burham Institute, La Jolla, CA). Immunodetection of $\beta 1$ and $\beta 4$ integrin and Lutheran was performed on cryosections of unfixed whole E14-E15 embryos or mouse intestines using rat monoclonal antibodies CD29 (clone 9EG7; BD Pharmingen), 346-11A (provided by Dr Kennel, Oak Ridge, TN) and rabbit polyclonal anti-Lutheran antibody (454, provided by Dr Le Van Kim, Inserm U665, Paris; ⁹). Detection of MyoD1, α smooth muscle actin and laminin $\alpha 5$ chain was performed on cultured mouse intestinal mesenchymal or adult smooth muscle cells. Cells were prefixed 10 min in 1% paraformaldehyde and permeabilized 10 min with 0.5 % Triton X-100 before incubation with mouse NCL-MyoD1 monoclonal (Novocastra; 1:20), α -smooth muscle actin (Sigma; 1:400) or polyclonal laminin $\alpha 5$ (kindly provided by Dr L. Sorokin, Münster, Germany) antibody. Bound antibodies were visualized with anti-mouse (Biorad), anti-rabbit (Nordic Immunological laboratories) or anti-rat (Jackson Laboratory) secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. DAPI 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). Pictures were taken with an Olympus digital camera. Control sections were processed as above with omission of the primary antibodies.

Reference List

1. Goulet O, Kedinger M, Brousse N, et al. Intractable diarrhea of infancy with epithelial and basement membrane abnormalities. *J Pediatr* 1995;127:212-219.
2. Ghate A, Befort K, Becker JA, et al. Identification of novel striatal genes by expression profiling in adult mouse brain. *Neuroscience* 2007;146:1182-1192.
3. Turck N, Lefebvre O, Gross I, et al. Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol* 2006;206:545-555.
4. Gradwohl G, Fode C, Guillemot F. Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* 1996;180:227-241.
5. Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, et al. Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol -Cell Physiol* 1996;39:C1666-C1674.
6. Olsen J, Lefebvre O, Fritsch C, et al. Involvement of activator protein 1 complexes in the epithelium-specific activation of the laminin $\alpha 2$ -chain gene promoter by hepatocyte growth factor (scatter factor). *Biochem J* 2000;347:407-417.
7. Turck N, Richert S, Gendry P, et al. Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells. *Proteomics* 2004;4:93-105.
8. Turck N, Gross I, Gendry P, et al. Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2005;303:494-503.
9. Rahuel C, Filipe A, Ritie L, et al. 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;294:F393-F406.

Résultats complémentaires de la partie 1

IV. Résultats complémentaires

Au vu des résultats obtenus au niveau de l'intestin embryonnaire des souris *lama5*^{-/-}, il était intéressant de rechercher les dérégulations entraînées par la perte de ce gène dans un intestin adulte. En effet, il est possible que celles-ci soient accentuées, ou peut-être compensées. De plus, un modèle adulte permettrait également de mieux séparer la contribution de chaque compartiment cellulaire, afin de préciser dans lequel se déroulent les dérégulations observées.

IV.1. Recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin adulte

IV.1.1. Description du modèle

Afin de pallier la létalité embryonnaire rencontrée chez les souris invalidées pour le gène *lama5*, j'ai utilisé une stratégie de type Cre/LoxP en croisant des souris *lama5* floxées (obtenues en collaboration avec le Dr. Lydia Sorokin; Münster, Allemagne) avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur Villine (collaboration avec le Dr. Sylvie Robine, Institut Curie, Paris), afin d'invalider spécifiquement la chaîne $\alpha 5$ dans l'épithélium intestinal, la villine étant une protéine du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales (El Marjou et al., 2004). Ces souris Villine-Cre *lama5*^{flox/flox} sont viables.

IV.1.1.1. Souris *lama5*^{flox/flox}

Les souris floxées pour le gène *lama5* possèdent un site loxP au niveau de l'intron 3-4 et un deuxième site loxP au niveau de son intron 6-7 (Figure 29). L'action d'une recombinaise Cre aboutit donc à la délétion des exons 4,5 et 6 du gène (Figure 29).

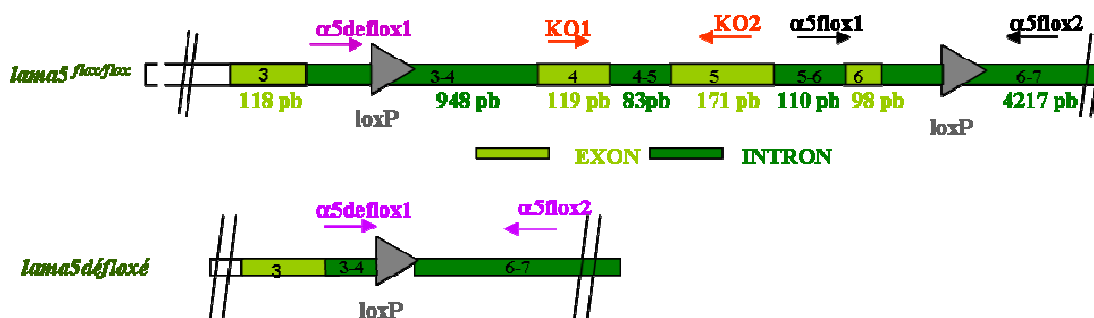


Figure 29 : schéma de la construction de l'allèle *lama5*^{flox/flox} et emplacement des oligonucléotides spécifiques à son génotypage ($\alpha 5$ flox1/ $\alpha 5$ flox2) et à la vérification de la délétion suite à l'action de la recombinaise ($\alpha 5$ deflox1/ $\alpha 5$ flox2). Les oligonucléotides KO1/KO2 servent de contrôle de l'allèle *lama5* wt.

Les souris *lama5*^{flox/flox} sont viables et fertiles. Elles ne présentent pas de différences morphologiques vis-à-vis de leurs fratries contrôles : elles ont donc un phénotype de type « sauvage ».

IV.1.1.2. Souris Villine-Cre

Dans les souris Villine-Cre, la recombinaise Cre est exprimée dans les cellules épithéliales intestinales le long de l'axe crypto-villositaire, et ceci tout le long de l'intestin (bien qu'elle

soit plus faiblement exprimée dans le côlon). Il existe deux lignées de ces souris, dont l'une peut montrer une expression de la villine dans le rein (El Marjou et al., 2004).

IV.1.2. Vérification de la délétion

Dans un premier temps, il s'agissait de s'assurer du bon fonctionnement du modèle d'étude. Pour cela, j'ai tout d'abord généré des primers capables de détecter spécifiquement l'allèle défloxe. Ensuite j'ai vérifié l'expression transcriptionnelle du gène *lama5* par RT-PCR et par hybridation *in situ*. Enfin, je me suis intéressée à l'expression de la recombinase Cre, par immunohistochimie et par traçage cellulaire en croisant les souris Villine-Cre avec des souris rapportrices Rosa26R.

IV.1.2.1. Recherche de l'allèle défloxe

La délétion du gène *lama5* s'effectuant spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal, j'ai cherché à obtenir de l'ADN provenant de ce tissu sans nécessairement tuer la souris. Pour cela, j'ai extrait de l'ADN à partir des crottes de l'animal : en effet, lors du transit, le bol alimentaire entraîne avec lui des cellules épithéliales intestinales. Une analyse par PCR classique avec les primers utilisés pour le génotypage amplifie de manière surprenante une bande dans l'ADN extrait à partir de crottes des souris Villine-Cre *lama5*^{flox/flox}. Ceci pourrait laisser supposer soit une contamination par exemple par de l'ADN provenant de l'estomac, où la délétion n'a pas eu lieu, soit une délétion partielle du gène. Une stratégie visant à rechercher l'allèle délété a donc été mise au point grâce à des oligonucléotides qui n'amplifient un fragment d'ADN que lorsque l'inactivation est effective. La zone floxée étant grande, des oligonucléotides placés de part et d'autre des sites LoxP ne pourront amplifier un fragment que si la zone est délétée (voir schéma de la construction **Figure 29**).

L'allèle délété est bien détectable dans les souris mutantes, mais la question reste posée de savoir si la délétion est totale ou s'il reste une certaine proportion de gène *lama5* non délété. Afin de répondre à cette question, j'ai recherché la possible expression transcriptionnelle résiduelle du gène.

IV.1.2.2. Expression transcriptionnelle du gène *lama5*

Sachant que l'expression transcriptionnelle du gène *lama5* est faible dans l'intestin (Lefebvre et al., 1999) elle a été recherchée par deux procédés : RT-PCR et hybridation *in situ*. Tout d'abord, j'ai comparé en RT-PCR l'expression transcriptionnelle du gène *lama5* dans l'épithélium intestinal (séparé du reste du tissu en le grattant délicatement à l'aide d'une lame de verre) à celle du reste du tissu après « scrapping » (composé de muscle et de *lamina propria*). Comme attendu, aucune expression du gène *lama5* n'a été détectée dans l'épithélium mutant, alors que de l'ARN codant pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine a pu être détectée dans le reste du tissu (puisque'elle n'y a pas été délétée). Malheureusement, aucune expression du gène n'a pu être détectée dans l'épithélium contrôle (**Figure 30**), ce qui ne permet pas de valider cette expérience.

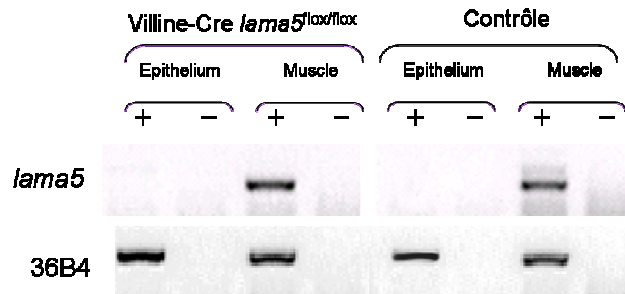


Figure 30 : recherche de la potentielle expression transcriptionnelle résiduelle du gène *lama5* dans l'épithélium intestinal mutant par RT-PCR ; 36B4 : gène de référence, - : contrôle RT

Ensuite, une hybridation *in situ* a été réalisée sur des intestins de souris Villine-Cre *lama5*^{flox/flox}, mais là encore malheureusement, la faible expression des ARNm de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'épithélium intestinal n'a pas permis de conclure.

IV.1.2.3. Expression de la recombinase Cre sous contrôle du promoteur Villine

- **Dans l'intestin adulte**

Si la potentielle activité transcriptionnelle résiduelle du gène *lama5* n'a pu être établie, il était nécessaire de rechercher l'expression de la recombinase Cre dans les souris Villine-Cre *lama5*^{flox/flox} que nous avons générées, afin de s'assurer qu'elle soit exprimée dans toutes les cellules épithéliales intestinales quel que soit le segment étudié (duodénum/côlon). Un marquage par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la protéine Cre a permis de confirmer son expression dans toutes les cellules épithéliales de l'intestin grêle, comme par exemple illustré ci-dessous dans le jéjunum (**figure 31**). Par contre, concernant le côlon, le marquage semble plus faible en intensité, ce qui laisse supposer une expression moindre dans ce segment de l'intestin (comme le concluait l'expérience de western blot publiée par El Marjou et al. en 2004).

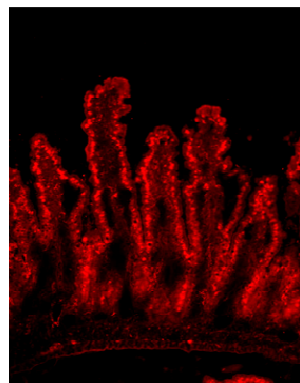


Figure 31 : immunomarquage de la recombinase Cre dans le jéjunum d'une souris Villine-Cre *lama5*^{flox/flox}

Cette expérience permet donc de confirmer que la recombinase Cre est bien exprimée dans nos souris de façon régulière et non mosaïque le long de l'axe crypto-villositaire et le long du tractus intestinal (même si c'est de façon amoindrie pour le côlon). La présence de la recombinase devrait donc permettre le défloxxage, mais ne nous permet pas d'affirmer que ce défloxxage sera total.

- **Lors du développement**

Aucun papier à ma connaissance ne définit précisément le stade embryonnaire à partir duquel la recombinaison Cre sous contrôle du promoteur Villine est exprimée. Or il est important de connaître ce paramètre afin de savoir si le gène *lama5* sera défloqué dès sa première expression. Afin de répondre à cette question, j'ai croisé des souris Villine-Cre avec des souris rapportrices Rosa26R (Soriano, 1999). Ces souris possèdent un gène codant pour la β -galactosidase inséré dans le locus Rosa, fort et ubiquitaire. Cette β -galactosidase ne peut pas s'exprimer tant que la cassette de polyadénylation placée en amont du gène et bloquant sa transcription n'est pas excisée. Ce procédé permet donc de suivre spécifiquement les cellules dans lesquelles la Villine s'exprime.

Le but de cette expérience est de savoir si le gène *lama5* peut être excisé dans l'intestin dès le début de son expression. J'ai donc analysé des embryons Villine-Cre Rosa26R aux stades embryonnaires E7,5 (donc avant l'organogenèse intestinale) et E10 (où les ébauches des organes sont visibles, afin de vérifier l'expression spécifique dans l'intestin primitif). J'ai ensuite coloré ces embryons *in toto* par une coloration X-gal qui fait apparaître les cellules tracées en bleu.

Cette expérience a permis de confirmer que la Villine était exprimée dès le stade E7,5 (**Figure 32A**) au niveau du sac vitellin et du feuillet endodermique (qui donnera naissance au futur intestin), et donc potentiellement capable d'exciser le gène *lama5* dès le début de son expression. L'absence de marquage dans les embryons contrôles atteste la spécificité de la réaction. Au stade E10, l'activité β -galactosidase est détectée au niveau des arcs branchiaux (futur pharynx), de l'intestin primitif, du cordon ombilical (où une anse du tractus digestif pourrait être logée) et des ébauches du pancréas (**Figure 32B**). Un mutant semble également montrer du marquage dans ce qui pourrait être les ébauches rénales, ce qui ne serait pas contradictoire avec les publications décrivant la souris Villine-Cre (El Marjou et al., 2004). Des coupes histologiques effectuées après inclusion des embryons colorés confirment le marquage au niveau du tractus intestinal, démontrant ainsi la spécificité d'expression de la villine (non illustré).

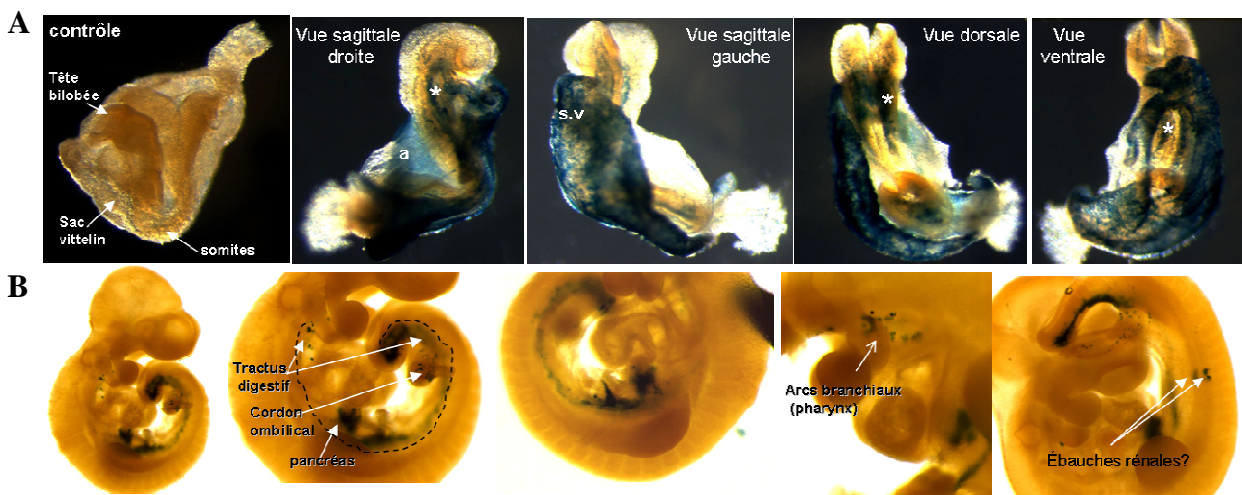


Figure 32 : coloration au X-gal des embryons Villine-Cre Rosa26R et contrôles. (A) Stade E7,5 ; (B) Stade E10
s.v. : sac vitellin, a : amnios, * : feuillet endodermique

IV.1.3. Perturbation de la lame basale dans les intestins mutants

Malgré un modèle qui semble valide (expression de la recombinase Cre avant l'organogenèse de l'intestin puis le long de l'axe crypto-villositaire, détection de l'allèle défloqué), on observe une persistance de l'immunomarquage de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin des souris mutantes adultes. Le marquage obtenu montre cependant que la lame basale est perturbée. En effet, un co-marquage avec un anticorps pan-laminine (révélant 10 isoformes sur 15) et un anticorps anti-collagène IV (autre composant de la lame basale) montre que la chaîne $\alpha 5$ ne co-marque pas avec la totalité de la lame basale : à certains endroits elle est absente, tandis qu'à d'autres elle semble comme juxtaposée et plutôt stromale. L'aspect global de la lame basale des mutants est perturbé par rapport aux intestins contrôles : elle semble discontinue, moins fine, ne suivant pas exactement la couche épithéliale (**Figure 33**). Ces observations sont plus prononcées au niveau de l'intestin proximal (duodénum essentiellement). Dans le côlon, les perturbations sont amoindries, voire inexistantes (non illustré).

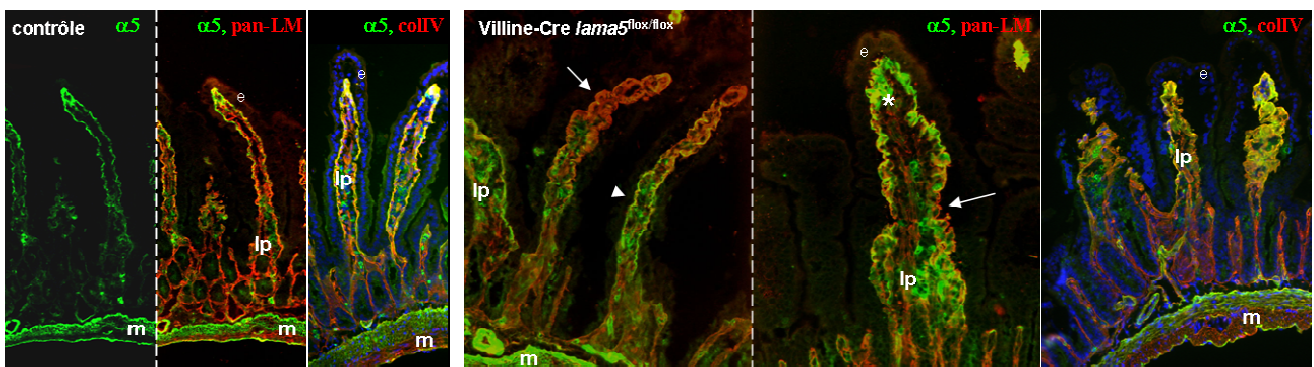


Figure 33 : immunofluorescence permettant de détecter soit les laminines avec un marqueur pan-laminine (pan-LM, rouge) soit un autre marqueur de la lame basale, le collagène IV (colIV, rouge) et la chaîne $\alpha 5$ de laminine (vert) dans le duodénum de souris contrôles et mutantes. Dans le contrôle, on observe un marquage de la chaîne $\alpha 5$ sous-épithéliale typique en gradient décroissant du sommet de la villosité vers les cryptes ; le marquage est fin et basal. Dans le mutant, la lame basale est désorganisée, et le marquage semble plus stromal que basal. Flèche : absence de marquage par l'anticorps anti- $\alpha 5$; tête de flèche : région où il existe un co-marquage entre la chaîne $\alpha 5$ et les autres laminines, * : expression stromale de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, e : épithélium, lp : lamina propria, m : muscle.

L'altération de la structure de la lame basale est accompagnée d'une dérégulation de l'expression des chaînes de laminines associées directement à la chaîne $\alpha 5$ que sont les chaînes $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$. En effet, leur immunomarquage montre une expression similaire à celle de la chaîne $\alpha 5$, à savoir une localisation plutôt liée au stroma sous-jacent (non illustré). Les récepteurs spécifiques de la chaîne $\alpha 5$ de laminine comme par exemple les intégrines $\beta 1 \beta 4$ ou $\alpha 3$ ne présentent quant à eux pas de différences majeures (distribution/intensité) entre les intestins contrôles et mutants (non illustré).

IV.1.4. Morphologie et cytodifférenciation

La lame basale étant présente mais vraisemblablement désorganisée, quels ont pu être les répercussions sur l'organisation morphologique intestinale ? L'observation histologique des intestins par des colorations à l'hématoxyline-éosine ou au bleu Alcian ont montré que la structuration globale de l'intestin est préservée (organisation cryptes/villosités) dans les mutants. Toutefois j'ai pu noter l'existence au niveau proximal de l'intestin de zones structurellement désorganisées ; certaines zones présentent un phénotype histologique de type colique (**Figure 34A**). Ces zones sont cependant très localisées, et variables d'un intestin

mutant à un autre. Elles peuvent être rapprochées des résultats publiés par le groupe du Dr. Miner (Mahoney et al., 2008), résultats qui seront commentés dans la discussion de la partie 1. Les marqueurs de différenciation intestinaux que sont la villine pour les entérocytes, le lysozyme pour les cellules de Paneth, le réactif de Schiff pour les cellules calciformes et la chromogranine A pour les cellules entéroendocrines ne montrent cependant pas de différences majeures entre intestins mutants (**Figure 34B**) et contrôles. A noter que dans les zones à phénotype colique le nombre de cellules calciformes est augmenté par rapport au segment intestinal correspondant.

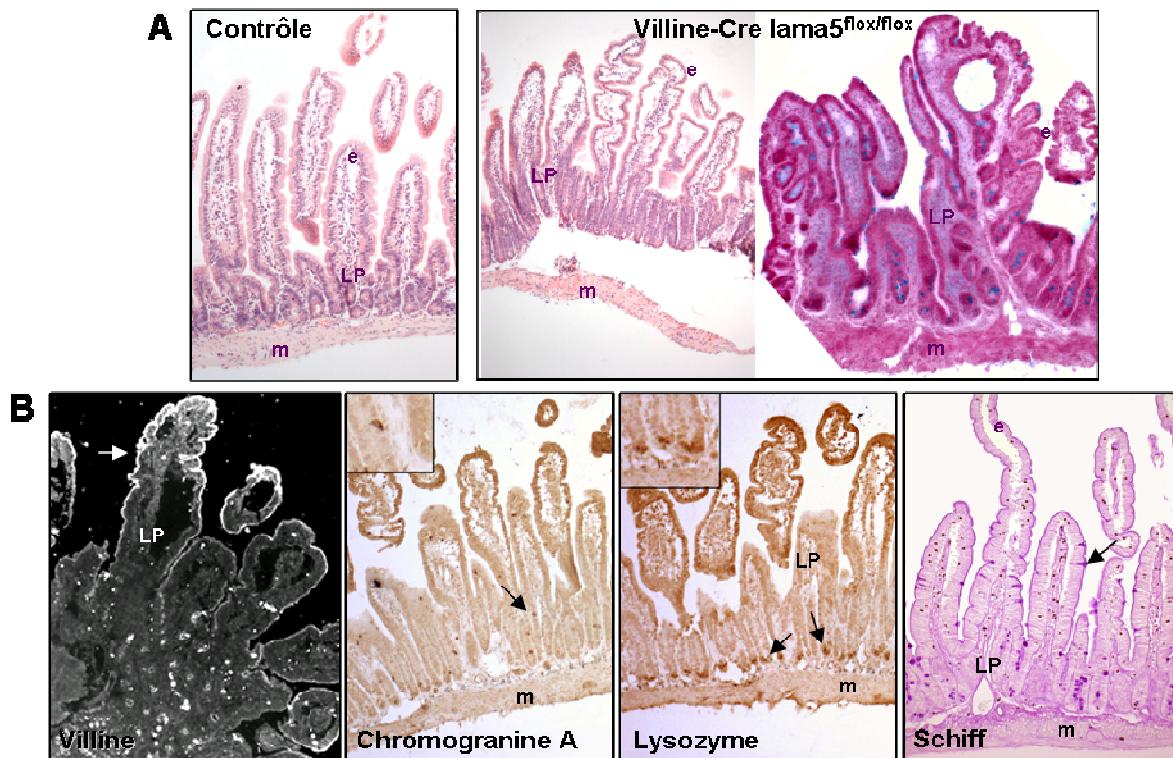


Figure 34 : (A) coloration à l'hématoxyline-éosine du duodénum de souris contrôle et mutante, et coloration au bleu Alcian d'une zone de type colique chez une souris mutante (panneau de droite). (B) immunomarquage ou coloration de différents marqueurs de cellules épithéliales (dans l'ordre : entérocytes, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth, cellules calciformes) dans le duodénum de souris mutantes. Lp : lamina propria, e : épithélium, m : muscle.

IV.2. Mise au point de lignées intestinales adultes de souris immortalisées

L'invalidation conditionnelle *in vivo* de la chaîne $\alpha 5$ de laminine ne permettant pas de conclure quant au rôle de cette chaîne dans l'intestin adulte du fait d'une persistance de son expression, une autre stratégie permettant de répondre à la problématique a été envisagée. Il s'agit cette fois d'obtenir un modèle d'étude *in vitro*, en mettant au point des lignées intestinales adultes de souris. L'obtention de lignées de cellules épithéliales intestinales étant très difficile, une stratégie d'immortalisation utilisant des souris immortomouse H-2K^b-tsA58 a été choisie (Whitehead and Robinson, 2009). Ces souris, qui possèdent l'antigène T (AgT) immortalisant du virus SV40, sont croisées avec les souris *lama5*^{flox/flox}, puis l'épithélium intestinal des souris mutantes est prélevé et mis en culture ; la délétion du gène floxé est faite *in vitro* par l'action d'un adénovirus portant une recombinaise Cre. L'antigène T

thermosensible est activé en culture par une température permissive (33°C) et l'adjonction d'interféron γ qui stimule le promoteur H-2K^b, ubiquitaire mais de force variable selon le type cellulaire. Ce travail a été l'objet du stage de Master 2 de M^{lle} Corinne Philipp que j'ai partiellement encadré.

IV.2.1. Caractérisation des lignées immortalisées obtenues

Parmi les 12 lignées établies, on observe une certaine hétérogénéité. Certaines lignées présentent un aspect morphologique typiquement épithélial (forme hexagonale) tandis que d'autres présentent un type morphologique fibroblastique (forme allongée) ou adipocytaire (nombreuses vésicules au niveau du cytoplasme) (**Figure 35**).



Figure 35 : aspect des différentes lignées intestinales immortalisées obtenues

Les cellules ont été caractérisées de façon plus précise par RT-PCR, en analysant les marqueurs clés des différents types cellulaires envisagés : la cytokératine-18 et la villine pour les cellules épithéliales, la desmine et l'Actg2 (Actin gamma-enteric smooth muscle 2) pour les fibroblastes, l'adiponectine pour les adipocytes et le CD31 pour les cellules endothéliales. Ces expériences ont démontré une forte hétérogénéité des lignées générées : aucune lignée pure ne contenant qu'un seul type cellulaire n'a pu être obtenue, si l'on se base uniquement sur les marqueurs testés en RT-PCR. Il existe cependant des lignées avec un type cellulaire dominant, au vu de l'intensité de détection des marqueurs spécifiques. Par la suite, des marquages histologiques et immunocytochimiques ont été réalisés pour confirmer ces résultats moléculaires : les lignées positives pour l'adiponectine ont été colorées à l'huile rouge pour révéler les gouttelettes lipidiques, des marquages de la β -caténine et de l'E-cadhérine ont permis d'approfondir la caractérisation des lignées à majorité épithéliale, et des marquages de l' α -actine de muscle lisse et de vimentine ont été utilisés sur les lignées à prédominance fibroblastique.

IV.2.2. Défloxxage du gène *lama5*

Les lignées ayant été caractérisées comme étant les plus épithéliales ont été infectées par des adénovirus (Ad CMV-Cre, exprimant la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur du Cytomégalo virus) en testant différentes MOI (multiplicity of infection). Le défloxxage des cellules est ensuite contrôlé par extraction de l'ADN et PCR, en utilisant les mêmes oligonucléotides que pour les souris *lama5*^{flox/flox}. Cette expérience a démontré que cette technique expérimentale permet l'excision des exons ciblés du gène *lama5*, mais que ce défloxxage n'était pas total : les oligonucléotides capables d'amplifier la région normalement délétée détectent une bande, toutefois moins importante pour les MOI testées les plus élevées. Des expériences de PCR quantitative ont permis d'estimer que l'excision du gène *lama5* 48h après infection était d'environ 50%. Malgré ce défloxxage, l'observation des cellules infectées

au microscope inversé ne montre pas de différences morphologiques drastiques comparées aux cellules non infectées. Il semble toutefois que le cytoplasme soit plus dense et plus condensé et que les jonctions cellulaires soient plus dilatées dans les cellules invalidées pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine (**Figure 36**).

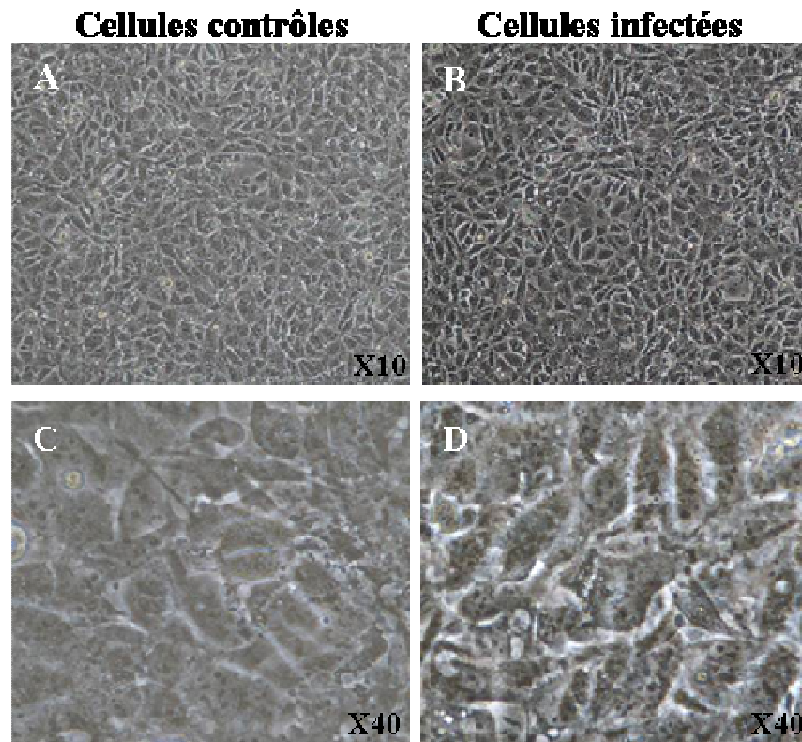


Figure 36 : aspect des cellules infectées par le vecteur Ad CMV-Cre. Observation au microscope inversé de cellules contrôles non infectées (**A, C**) et de cellules 48h après infection avec une MOI 50 (**B, D**). A noter une légère distension des jonctions intercellulaires et une densification du cytoplasme après infection, plus visible au X40.

Discussion des résultats de la partie 1

V. Discussion des résultats

L'objectif de ce travail était de pouvoir étudier le rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin en développement et dans l'organe mature. L'importante expression de cette chaîne dans l'intestin suggère en effet qu'elle joue un rôle déterminant dans l'homéostasie tissulaire par rapport aux autres chaînes α de laminine. Une dérégulation de la chaîne $\alpha 5$ associée à la laminine-511 a ainsi été observée dans plusieurs pathologies intestinales, confortant le rôle essentiel de cette chaîne dans le bon fonctionnement de l'organe (Bouatrouss et al., 2000; Alpy et al., 2005; publications 1 et 2 en cours).

Il a paru opportun d'étudier le rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine d'emblée par des modèles de souris invalidées pour cette chaîne : modèles de souris totalement invalidées et système d'invalidation conditionnelle ciblée à l'intestin (au moyen d'un système Cre/LoxP). Par ce biais, nous nous trouvons dans un contexte physiologique *in vivo*, où ont lieu les interactions entre les cellules (notamment les interactions épithélio-mésenchymateuses) et les régulations aussi bien transcriptionnelles qu'hormonales ou par les cytokines.

V.1. La chaîne $\alpha 5$ régule 2 voies de signalisation aboutissant à des effets biologiques variables

Grâce au modèle d'invalidation totale combiné à une analyse transcriptomique, il a pu être établi que la chaîne $\alpha 5$ de laminine régulait l'expression de gènes cibles impliqués dans des mécanismes de régulation tels que la différenciation, et permettait de médier des signaux qui peuvent influencer le devenir cellulaire et l'intégrité tissulaire.

Les données obtenues par l'analyse transcriptomique ont permis tout d'abord de mettre en évidence un lien mécanistique entre la déficience en gène *lama5* et le phénotype intestinal mésenchymateux observé dans les embryons mutants. En effet, en absence de chaîne $\alpha 5$ de laminine, l'expression de certains gènes spécifiques du mésenchyme est diminuée comme par exemple la desmine, protéine des filaments intermédiaires, mais également une surexpression -voire une ré-expression- de MyoD, facteur impliqué dans la régénération musculaire. En effet, MyoD est un facteur de transcription impliqué dans le lignage des cellules musculaires squelettiques, mais peut également être exprimé dans les cellules progénitrices intestinales et les guider vers une différenciation en cellules musculaires lisses (Gerhart et al., 2001).

Ce rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la différenciation n'est pas restreint à l'intestin puisque son implication dans la différenciation cellulaire d'autres organes a été décrite : à titre d'exemple, dans la différenciation et la morphogenèse des follicules pileux. En effet, la chaîne $\alpha 5$ de laminine est très exprimée durant l'élongation folliculaire. Reliée à cette donnée, il a été montré que les souris *lama5*^{-/-} présentent près de deux fois moins de follicules pileux que les souris contrôles (Li et al., 2003; Gao et al., 2008), et que des greffes de peau d'embryons invalidés pour le gène *lama5* à des souris nude ne permettait pas le développement d'une pilosité. Un autre exemple du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans la différenciation des cellules est celui du développement du bourgeon dentaire. En effet, les souris *lama5*^{-/-} présentaient des anomalies de développement du bourgeon dentaire, qui est de taille réduite, avec une absence de formation de la pointe de la dent (Fukumoto et al., 2006).

L'analyse transcriptomique des souris *lama5^{-/-}* a par ailleurs permis de faire ressortir des gènes liés à deux voies de signalisations, les voies Wnt et PI3K/Akt. Des expériences complémentaires (in vitro par techniques siRNA, culture sur matrice, système TOPflash) nous ont permis de dégager un schéma hypothétique quand au rôle potentiel de la chaîne $\alpha 5$ lors du développement intestinal (**Figure 38**).

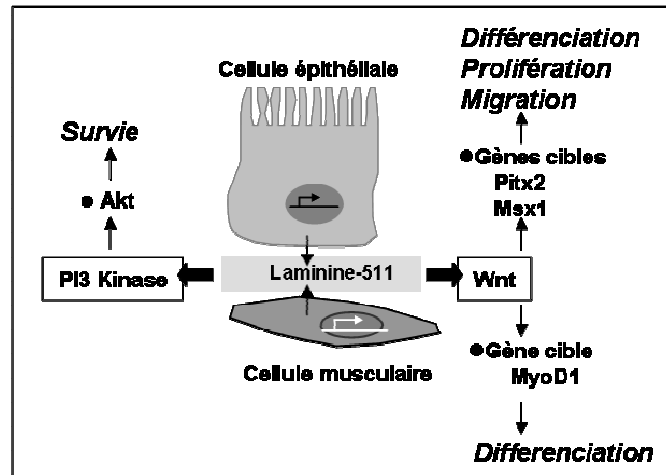


Figure 38 : schéma résumant le rôle potentiel de la chaîne $\alpha 5$ lors du développement intestinal. La chaîne $\alpha 5$ peut moduler les voies Wnt et PI3K et influencer ainsi le devenir cellulaire via des gènes cibles.

Quelques études ont récemment suggéré un lien entre les laminines et ces deux voies de signalisation. Ce lien a été prouvé de façon indirecte via l'intégrine $\alpha 3\beta 1$, récepteur majeur de la laminine-511. Cette intégrine agit de manière coordonnée avec c-Met, récepteur à tyrosine-kinase, pour réguler l'expression d'un gène de la famille Wnt, *Wnt7b*, chez la souris (Liu et al., 2009). De manière plus complexe, grâce au modèle souris knock-out *lama5^{-/-}*, une boucle de rétrocontrôle concernant la régulation de voies de signalisation via la laminine-511 a pu être déterminée. Cette boucle implique les voies BMP et Wnt. Parallèlement à l'intestin, cette régulation fait intervenir les interactions épithélio-mésenchymateuses (Gao et al., 2008). Par contre, notre analyse transcriptomique des intestins *lama5^{-/-}* n'a pas révélé de dérégulation de gènes appartenant à la voie BMP.

Par ailleurs, un lien entre les voies de signalisation Wnt et PI3K/Akt a également été mis en évidence : Akt pourrait participer à l'activation de la β -caténine induite par Wnt qui stimule la prolifération dans le cycle cellulaire au niveau des cellules souches intestinales (pour revue, voir Scoville et al., 2008). Ce mécanisme de coopération a également été proposé très récemment dans les rectocolites ulcéro-hémorragiques chroniques grâce à des modèles animaux de colites inflammatoires : la voie de signalisation PI3K/Akt coopère avec la voie Wnt pour augmenter le signal β -caténine durant l'inflammation (Lee et al., 2010). Ce résultat est à rapprocher de nos observations concernant la maladie de Crohn, où nous avons pu démontrer une accumulation nucléaire de la β -caténine (cf. publication 2).

V.2. La chaîne $\alpha 5$ régule la morphogenèse intestinale adulte

Le système d'inactivation conditionnelle ciblée à l'épithélium intestinal nous a fourni une stratégie permettant de rechercher le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin adulte. Elle n'a

malheureusement apporté que peu de résultats. J'ai tout de même pu observer un phénotype colique dans quelques régions au niveau de l'intestin proximal, mais de façon sporadique, et de façon très variable d'un intestin mutant à l'autre. Au cours de mon doctorat, le groupe du Dr. Miner a publié une étude de « sauvetage » du phénotype d'inactivation de la chaîne $\alpha 5$ en croisant les souris $lama5^{-/-}$ avec des souris transgéniques exprimant le gène $lama5$ complet (Mahoney et al., 2008). Il se trouve que ces souris ré-expriment la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans tous les organes (permettant ainsi un développement normal) sauf dans l'intestin. L'architecture crypto-villositaire des intestins grêles de ces souris est perturbée, montrant des fusions de villosités (**Figure 39**). Un marquage au bleu Alcian de ces intestins grêles transgéniques révèle un marquage similaire à celui observé dans le côlon de souris contrôles, c'est-à-dire riche en sulfomucines. Ainsi les données que j'ai acquises, quoique sporadiques, grâce aux souris Villine-Cre $lama5^{flox/flox}$ ont pu être confirmées par un autre modèle, confortant le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans la morphogénèse intestinale.

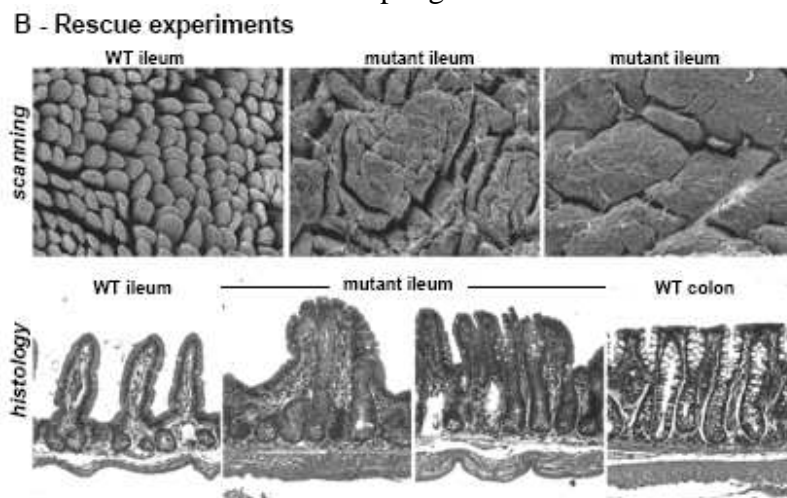


Figure 39 : illustration du phénotype de type colique observé au niveau de l'intestin grêle mutant dans les souris $lama5^{-/-}$ exprimant le transgène Tg- $lama5$ (tirée de Simon-Assmann et al., 2010).

Le phénotype colique observé à de rares endroits de l'intestin proximal a également déjà été suggéré par l'étude de xénogreffes. En effet, mon équipe a réalisé des greffes de fragments intestinaux issus de souris $lama5^{-/-}$ aux stades E12 et E14 sous la peau de souris nude adultes afin d'outrepasser la létalité embryonnaire (Bolcato-Bellemin et al., 2003). Les greffons obtenus prenaient l'apparence de tissu de type colique. De plus, l'absence de chaîne $\alpha 5$ dans ces greffons est accompagnée d'une surexpression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine, d'un dépôt de chaîne $\alpha 2$ plus étendu, et d'une expression ectopique de chaîne $\alpha 4$. Ces expressions des chaînes α suggèrent d'éventuels mécanismes de compensation moléculaire en l'absence de chaîne $\alpha 5$.

V.3. L'absence de chaîne $\alpha 5$ épithéliale entraîne vraisemblablement une compensation tissulaire

L'autre résultat mis en évidence par l'inactivation conditionnelle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'épithélium intestinal est une désorganisation de la lame basale. La persistance du marquage de la chaîne $\alpha 5$ peut s'expliquer soit par un déflorage partiel soit plus vraisemblablement par des mécanismes de compensation tissulaire. En effet, en absence de production par les cellules épithéliales, les cellules du mésenchyme peuvent prendre le relais et sécréter la chaîne

$\alpha 5$, ce qui pourrait expliquer la localisation stromale que nous avons observée (**Figure 40**). Toutefois l'hybridation *in situ* n'a pas permis de vérifier cette hypothèse, l'hypersécrétion étant potentiellement très localisée et due aux myofibroblastes péricryptaux peu abondants.

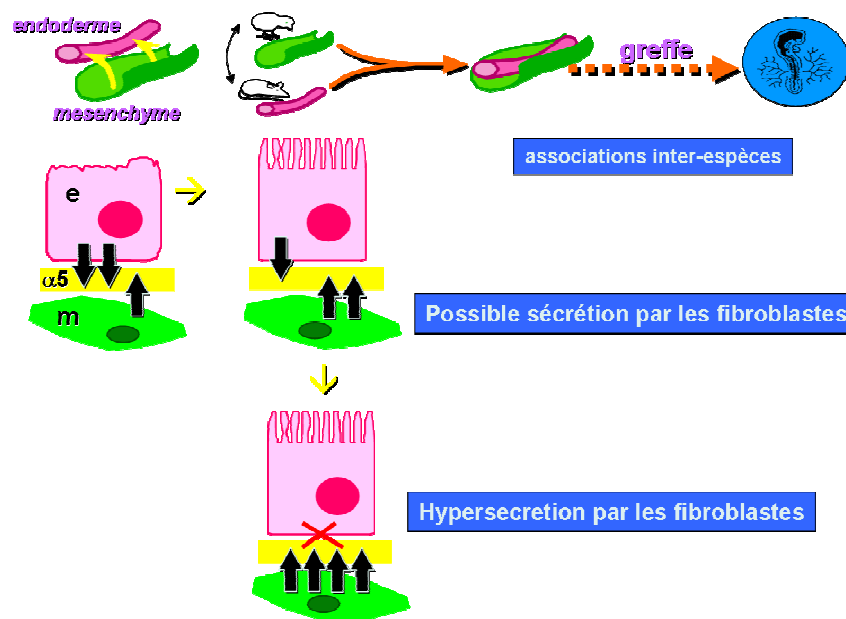


Figure 40 : hypothèse d'un mécanisme de compensation tissulaire. Des greffes d'associations inter-espèces et l'utilisation d'anticorps espèces-spécifiques ont permis d'établir que lors du développement, la chaîne $\alpha 5$ de laminine est déposée majoritairement par les cellules épithéliales. Dans des phases plus tardives du développement, les cellules fibroblastiques peuvent prendre le relais (Lefebvre et al., 1999). En cas d'absence de sécrétion de la chaîne $\alpha 5$ de laminine par les cellules épithéliales, les fibroblastes pourraient compenser cette déficience par une hypersécrétion.

Cependant, la dérégulation de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ entraîne tout de même une dérégulation des chaînes β et γ qui lui sont classiquement associées, ce qui pose la question de l'assemblage et de la régulation génétique des laminines. En effet, il a été décrit pour la laminine-111 que les interactions ioniques favorisent la formation de dimères $\beta 1\gamma 1$. Ce dimère est ensuite stabilisé par l'adjonction de la chaîne α . La sécrétion des chaînes β et γ nécessiterait la présence des 3 chaînes, et donc la chaîne α serait le facteur indispensable et limitant à la correcte sécrétion de l'isoforme de laminine (Tunggal et al., 2000).

Les autres chaînes α qui auraient pu entrer dans un mécanisme de compensation moléculaire comme ce qui a été observé pour les embryons invalidés pour la chaîne $\alpha 5$, ne sont quand à elles pas dérégulées dans ces intestins adultes.

Afin de remédier à la possible compensation par les fibroblastes, nous avons envisagé de croiser les souris Villine-Cre *lama5^{flox/flox}* avec des souris exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans les fibroblastes. Fsp1 (fibroblast-specific protein 1) est un marqueur des myofibroblastes (Strutz et al., 1995). Une souris Fsp1-Cre a été générée (Bhowmick et al., 2004), mais il semblerait qu'il n'y ait pas d'expression de la Fsp1 au niveau de l'intestin normal (communication personnelle). D'autre part, nous aurions aimé croiser nos souris avec des souris α SM1-Cre (α smooth muscle actin) ou SM22-Cre (marqueur du muscle lisse adulte), afin de voir l'effet de la délétion dans les cellules musculaires, compte tenu du phénotype observé chez les embryons invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine. Ce croisement n'a pas pu être réalisé pour l'instant, dans le cadre de notre collaboration avec le Dr. Sorokin.

V.4. Établissement de lignées intestinales déficientes en chaîne $\alpha 5$ de laminine : une voie de sauvetage ?

Une autre manière d'aborder le rôle de la chaîne $\alpha 5$ dans l'intestin adulte est l'utilisation d'un modèle de culture cellulaire. Ainsi nous avons opté pour l'obtention de lignées épithéliales intestinales adultes immortalisées. L'avantage de ce modèle sera de pouvoir directement comparer des cellules issues d'un même clone, les une délétées pour le gène *lama5* grâce à l'action d'un virus portant une recombinaison Cre et les autres l'exprimant normalement. Les résultats obtenus à partir de l'analyse du transcriptome des souris *lama5*^{-/-} pourront ainsi être étudiés de façon plus fine sur un modèle pur qui permettra de spécifier le compartiment cellulaire (épithélial/musculaire).

L'expression de différents marqueurs spécifiques révélés en RT-PCR suggère que les lignées obtenues ne seraient pas composées strictement d'un seul type cellulaire. Ceci peut s'expliquer soit par une contamination lors de la dissociation du tissu, soit par l'existence de cellules souches ou progénitrices dans les lignées obtenues, qui pourraient ensuite se différencier en types cellulaires distincts. En effet, il a été récemment publié que des cellules épithéliales coliques humaines immortalisées expriment la vimentine et l'actine de muscle lisse lorsqu'elles prolifèrent. Lorsque leur prolifération est bloquée, ces cellules perdent leurs marqueurs de différenciation, et expriment des marqueurs de cellules souches (Roig et al., 2010). De plus, il est possible que ces cellules soient en transition épithélio-mésenchymateuse, qui se produit généralement lors des processus tumoraux (Thiery et al., 2009), ce qui pourrait expliquer un marquage fibroblastique dans des cellules d'aspect épithélial. Toutefois, au vue de l'observation morphologique des lignées obtenues, la majorité des cellules qui composent une lignée semble appartenir à la même famille de cellules. Il sera important de trier ces cellules par cytométrie de flux afin d'obtenir des populations parfaitement homogènes.

Le déflochage de ces cellules reste encore à être mis au point, pour obtenir une délétion complète du gène *lama5*. Une meilleure homogénéité au départ des lignées pourrait probablement améliorer les résultats obtenus. Une autre stratégie serait d'utiliser un autre vecteur de la recombinaison Cre, comme par exemple des lentivirus.

Ces cellules permettront d'étudier le mécanisme de dépôt de la chaîne $\alpha 5$ de laminine au niveau de la lame basale et les éventuels phénomènes de compensation tissulaire, grâce à des modèles de co-culture inter-espèces associant par exemple des cellules épithéliales *lama5*^{-/-} avec des fibroblastes humains et des anticorps spécifiques de chaque espèce. Dans le même ordre d'idée, l'association de cellules épithéliales invalidées ou non pour le gène *lama5* avec des fibroblastes tumoraux permettront d'étudier les interactions particulières entre l'épithélium et le mésenchyme dans le contexte pathologique qu'est le cancer.

Partie 2 : Recherche du rôle des laminines dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

I. Base du projet

La physiopathologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), qui sont représentées par la maladie de Crohn et la rectocolite ulcéro-hémorragique, est pour l'instant encore mal comprise (voir introduction, p.31). La dérégulation de la réponse immunitaire intestinale et les altérations de la matrice extracellulaire peuvent jouer un rôle dans la communication entre les cellules épithéliales et les cellules de la lamina propria. Parmi les protéines extracellulaires, les laminines jouent un rôle d'ancrage pour les cellules épithéliales, et la té nascine-C contribue à la migration cellulaire. Malgré leur rôle central dans la cohésion et la migration des cellules épithéliales, peu d'attention a été accordée à leur expression dans les MICI et les données ne sont que parcellaires et descriptives (voir introduction, p.55). A titre d'exemple, seule une description essentiellement par immunofluorescence et par RT-PCR des chaînes $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ de laminine a été réalisée dans les intestins de patients atteints de maladie de Crohn et cela uniquement dans la partie grêle (Bouatrouss et al., 2000).

Par ailleurs, une certaine proportion de MICI caractérisées par des phénomènes successifs d'inflammation et de régénération de l'intestin, peuvent, surtout s'ils affectent le côlon et le rectum, dégénérer en cancer colorectal (voir introduction p. 36). La question se posait ainsi de savoir s'il existait une possible intervention des chaînes de laminines dans la pathologie et la progression des MICI, en se focalisant sur le côlon.

Grâce à une collaboration avec le service de gastroentérologie (Pr. Duclos, Dr. Lacroute) et celui d'anatomopathologie (Dr. Méchine-Neuville) du CHRU de Strasbourg, nous avons accès à des prélèvements coliques de patients atteints de maladie de Crohn et de rectocolites ulcéro-hémorragiques dans le but de connaître le profil d'expression des diverses isoformes de laminine connues actuellement et ceci dans les côlons inflammatoires. **L'examen de ces prélèvements m'a permis de mettre en évidence des glandes atypiques qui ont pu être caractérisées. Enfin j'ai développé des modèles d'inflammation colique sur des animaux transgéniques surexprimant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminine (générés au laboratoire par le Dr. Lefebvre) dans le but d'analyser les possibles répercussions sur l'inflammation.**

La publication 2 en cours de rédaction présentée ci-après décrit les principaux résultats que j'ai pu obtenir sur cette étude. Ce travail n'étant pas finalisé, des notes mentionnées dans le manuscrit renverront à des expériences qui restent à être réalisées et qui sont détaillées dans la partie IV (p.153).

II. Résumé des résultats de la publication 2

Lors des phénomènes d'ulcération et de réparation qui caractérisent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la matrice extracellulaire est sans cesse remodelée, participant ainsi à la restauration de l'intégrité tissulaire. Il était donc intéressant de voir en quoi les laminines, molécules clés de la lame basale, pouvaient participer à ces processus. Dans le tissu inflammatoire des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite-hémorragique, différentes zones sont observables. Premièrement des zones très ulcérées où la lame basale est détruite. Deuxièmement des zones de réparation, où les éléments de la matrice peuvent être dérégulés. C'est le cas en particulier pour les chaînes $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ de laminines (**Supplementary figure 3, publication 2**). En effet, la chaîne $\alpha 1$ de laminine, normalement

absente du côlon normal, est exprimée dans la lame basale sous-épithéliale du fond des glandes coliques des patients atteints de MICI. Parallèlement, la chaîne $\alpha 5$ de laminine, et dans une moindre mesure la chaîne $\alpha 3$ sont exprimées de façon ectopique dans cette même région, zone où elles sont normalement absentes dans le côlon non affecté. Troisièmement, on peut observer des glandes atypiques caractérisées par une structuration particulière des cellules et qui sont entourées d'une lame basale fortement enrichie en chaînes $\alpha 1$, $\alpha 5$ et dans une moindre mesure $\alpha 3$ (**Figure 2, publication 2**). Ces glandes présentent une forte analogie avec celles décrites par l'équipe du Dr. Wright (Wright et al., 1990) comme étant des glandes associées aux ulcères dénommées UACL (ulcer-associated cell lineage) (**Figure 1, publication 2**), définies par leur profil particulier d'expression des mucines et des facteurs en trèfles TFF (voir discussion p. 159)

La chaîne $\alpha 1$ et potentiellement la chaîne $\alpha 5$ pouvant être impliquées dans le cancer colorectal (données de l'équipe; thèse de Ivo Jivkov, 2008 ; De Arcangelis et al., 2001 et introduction p.56) et les MICI pouvant dégénérer en cancer, nous avons recherché une potentielle accumulation nucléaire de la protéine p53, premier facteur muté dans les cancers associés aux colites (voir introduction p. 37). Nous avons ainsi pu montrer que les glandes UACL présentaient de nombreux noyaux avec une accumulation nucléaire de la protéine p53 (**Figure 4, publication 2**). Parallèlement, une certaine proportion des cellules composant ces glandes possède un marquage nucléaire de la β -caténine.

Afin de déterminer un lien potentiel entre l'accumulation nucléaire de la protéine p53 et la forte expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines dans la lame basale entourant ces glandes, des expériences *in vitro* ont été menées. Elles ont révélé que les laminines-111 et -511 (constituées respectivement des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$) utilisées en tant que substrat n'étaient pas capables d'activer l'expression de p53 dans des cellules épithéliales intestinales. Par contre, des expériences de transfection m'ont permis de montrer que p53 est capable de stimuler spécifiquement l'expression endogène des transcrits de la chaîne $\alpha 1$ de laminine, suggérant que l'accumulation de p53 précède celle des laminines (**Figure 5, publication 2**).

Parallèlement, nous avons cherché à savoir si les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines pouvaient réguler l'inflammation, grâce à des modèles de souris transgéniques surexprimant l'une ou l'autre chaîne spécifiquement dans l'épithélium intestinal au moyen du promoteur villine. Les souris Tg-*lama1* et Tg-*lama5* ont été soumises à un traitement au DSS, induisant une inflammation au niveau du côlon et du rectum. L'établissement du score histologique d'inflammation a permis de montrer que ces souris transgéniques surexprimant aussi bien la chaîne $\alpha 1$ que la chaîne $\alpha 5$ présentaient une inflammation moins sévère que leurs contrôles (**Figure 3, publication 2**).

Enfin, afin de modéliser la dégénérescence des MICI en cancer, les souris surexprimant les chaînes $\alpha 1$ ou $\alpha 5$ de laminines dans l'intestin ont été traitées à l'action combinée du DSS à l'AOM, agent carcinogène. Ces souris présentent une accumulation nucléaire de la protéine p53 dans les cellules de certaines glandes coliques situées dans des zones probablement régénératives. Parallèlement on observe une perte de MUC2, comme dans les glandes UACL que nous avons observée dans les prélèvements de MICI (**Figure 6B et C, publication 2**). D'autre part, un plus grand nombre de souris Tg-*lama1* a développé des zones tumorales par rapport aux souris contrôles. Dans ces zones tumorales, on observe également une corrélation inverse entre p53 et MUC2, à savoir une accumulation nucléaire de la protéine p53 et une perte de MUC2 (**Figure 6D et E, publication 2**).

III. Publication 2: Nuclear p53 accumulation is associated with laminin upregulation in inflammatory bowel diseases

Nuclear p53 accumulation is associated with laminin upregulation in inflammatory bowel diseases

Caroline Spenlé¹, Olivier Lefebvre¹, Joël Lacroute^{1,2}, Agnès Méchine-Neuville³, Klaus-Peter Janssen⁴, Bernard Duclos^{1,2}, Christiane Arnold¹, Donald Gullberg⁵, Michele Kedinger¹, Lydia Sorokin⁶, Gertraud Orend¹, Patricia Simon-Assmann¹

¹ Inserm, U682, Strasbourg, F-67200 France; Univ de Strasbourg, F-67000 France; ² Department of Gastroenterology, CHRU Hautepierre, F-67200 Strasbourg, France; ³ Department of Anatomy and Pathology, CHRU Hautepierre, F-67200 Strasbourg, France; ⁴ Department of Surgery, München, Germany; ⁵ Department of Biomedicine, University of Bergen, Norway; ⁶ Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, Germany.

Key words: Laminins; inflammatory bowel diseases; p53

Grant support:

This work has been supported by Inserm, by the Association pour La Recherche sur le Cancer (ARC), the Institut National du Cancer (PSA, GO), and the Hopital Hautepierre, Strasbourg (GO). CS was recipient of fellowships from the French Ministry of Research and Education and the Ligue contre le Cancer.

Abbreviations:

BM: basement membrane; ECM: extracellular matrix; LM: laminin; IBD: Inflammatory bowel disease; CD: Crohn's disease; UC: Ulcerative colitis; UACL: ulcer associated cell lineage

Correspondence:

Patricia SIMON-ASSMANN

Inserm U682

Homeostasis of the tissue to cancer and inflammation

3, Avenue Molière 67200 Strasbourg- France

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

Phone: (33) 3 88 27 53 56 - Fax: (33) 3 88 26 35 38

Conflicts of interest:

The authors disclose no conflicts

Author contribution:

CS: study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript

OL: establishment of mouse models; acquisition of data

JL: acquisition of data on human samples

AMN: expertise in anatomo-pathology

KPJ: establishment of mouse models

BD: human samples

CA: expertise in histology and immunohistochemistry

DG: antibody contribution

MK: establishment of collaboration, funding, critical revision of the manuscript

LS: *lama5* construct; laminin antibodies

GO: analysis of data; funding; critical revision of the manuscript

PSA: study concept, design and supervision; drafting of the manuscript; funding

Introduction

A certain percentage of cancer cases are thought to arise from chronic inflammation. One of the best examples of this is the colon cancer which often develops following inflammatory bowel disease.¹ Inflammatory bowel diseases (IBD) that comprise Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are multifactorial pathologies as genetic and environmental factors play an important role in the pathogenesis of these disorders.² It becomes apparent that the risk of colorectal cancer is similar in magnitude between Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).^{3,4} Chronic inflammation is the answer to homeostatic imbalance, phenomenon that also characterizes tumor development.⁵ This aberrant homeostasis is linked to several events among which oncogene activation, and deregulation of inflammatory mediators such as TNF α .⁶ A possible causative role for the mutated p53 tumor-suppressor gene in colitis-associated neoplasia is more and more obvious. Indeed, p53 point mutations often linked to p53 overexpression were identified in dysplastic and nondysplastic areas in neoplastic progression in ulcerative colitis.⁷⁻⁹ Although p53 positive cells were identified by immunostaining in intestinal biopsies from UC patients,¹⁰ no clear data are available regarding their position in the crypt region and more importantly about the significance of the presence of such cells in IBD samples.

Inflammatory responses are often associated to extracellular matrix (ECM) remodeling as clearly shown in wound healing and tissue repair. ECM molecules play a major role in tissue integrity/plasticity and participate to adapt the microenvironment to changing situations. Profound alterations in ECM molecules and their cell surface integrin receptors have been found in a number of inflammatory processes.^{11,12} In intestine, as in many organs matrix molecules are composed of a variety of complex macromolecules among which proteoglycans, and various adhesive or anti-adhesive glycoproteins. Basement membranes represent a specialized form of extracellular matrix. Like in other epithelial-mesenchymal organs, the intestinal basement membrane that separates epithelial cells from the underlying connective tissue is composed mainly of collagen IV, laminins (LMs), perlecan and nidogens. Wide arrays of human disorders result from or are associated with defects in BM assembly or composition.¹³ LMs are a family of BM glycoproteins, each containing an α -, β - and γ - chain that assemble into characteristic heterotrimeric structures. LMs are known to mediate many essential properties that are important to cell adhesion, migration and proliferation; they are also known to protect cells from apoptosis.¹³⁻¹⁵ Immunodetection data indicate that several LMs exist in the human intestine among which LM-111 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), -511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) and -332 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) presenting developmental and regional specific expression along the crypt-villus axis.^{16,17} BM macromolecules are known to be synthesized and assembled by synergistic involvement of both epithelial and adjacent stromal cells.^{17,18} Due to their *in vivo* location and to their role in maintaining homeostasis, LMs are likely to participate in inflammation accompanied by structural remodeling. In IBD, intestinal inflammation leads to mucosal ulceration and subsequent tissue repair that implies a continual remodeling of the BM with a balance between synthesis and breakdown of its components.

Some sporadic data exist on the expression of epithelial BM constituents in IBD. In colonic tissue from patients with UC, loss of immunoreactivity to LM (with a pan-LM antibody) in the BM is accompanied by an increase in collagen IV and V expression.¹⁹ In inflamed segments of CD small intestine, altered expression of some LM α chain (decrease in $\alpha 2$, increase in $\alpha 3$ and $\alpha 5$ chains) were noted in the crypt region²⁰ strengthening the notion that the equilibrium between individual LM isoforms are crucial for tissue homeostasis and

presumably also for cell functions. Unexpectedly, no BM changes were detected in coeliac intestinal mucosa, although characterized by lymphocyte infiltration and profound morphological alterations.²¹ Among the genes identified by mRNA profiling in affected inflamed colonic UC patients are genes associated with tissue remodeling such as LAMA2 (encoding LM α 2 chain) whose mRNA are more abundant in UC samples.²² Of note is the fact that serum concentrations of LM (presumably LM-111) are increased in patients with IBD (UC or CD patients) while concentrations of collagen IV are decreased.²³ *In vitro* studies using normal intestinal epithelial cells, allowed to further show that the two proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ synergistically modulate the expression and secretion of LM α 5 and γ 2 chains.²⁴

In the present study, we investigated whether laminins may be involved in IBD or in IBD-associated colorectal cancer. We combined immunohistochemistry on human samples from patients with IBD, established new transgenic laminin mouse models that were submitted to colitis and performed *in vitro* experiments to approach the link between laminins and p53 in IBD.

Materials and Methods

Human tissue specimens and scoring of the inflammation

Paraffin embedded tissues obtained from 25 patients who had undergone intestinal resection for active Crohn's diseases (CD) of the colon were studied. For each patient, non-inflamed control samples were also obtained. Colon samples were also obtained from 7 patients with ulcerative colitis (UC), and from 11 patients with acute sigmoiditis (as inflamed controls). As non inflammatory controls, 15 colon tissues distant from colon carcinoma were used. In parallel samples for immunofluorescence staining had been embedded in Tissue-Tek (Sakura, Labonord), frozen on dry ice immediately and kept at -80°C until used. Assessment of the inflammatory state was determined by a pathologist using the Riley score²⁵ and confirmed by immunostaining for CD45, CD68 and TLR4 (**Supplementary Figure 1**).

Plasmid constructs

LMα1 plasmid construct

The plasmid pBS-villin promoter containing 3.5 kb of the murine promoter, the first non coding exon, the 5.5 kb of the first intron and a small part of the second villin exon²⁶ was kindly provided by Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, France). The EcoRI site in the multi cloning site was destroyed using T4 polymerase according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Site directed mutagenesis (GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System, Promega, Charbonnières-les-Bains, France), was then used to introduce a BsiWI site just before the start codon of the villin gene using the 5'phosphorylated CCTTCTCCTCTAGGCTCGCGTACGATGACGTCGGACTTGCGG3' primer and according to the manufacturer's instructions. A double strand annealed oligonucleotide, 5'GGCCGGACGCGTGAATTCGTCGACGC3' and 5'GGCCGCGTCGACGAATTCACGCGTCC3', containing restriction sites for MluI, EcoRI and SalI, was inserted in the NotI present in the multi cloning site, generating plasmid pBS-villin promoter MES. The SV40 polyA region of the pEGFP plasmid (Clontech, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) was PCR amplified using the primers 5'GGCGCCTCTAGATCATAATCAGCCATA3' and 5'GGCGCCCTTAAGATACATTGATGAGTT3' and subcloned in pGEMTeasy vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). After EcoRI digestion, the SV40 polyA fragment was gel purified using the NucleoSpin Extract II kit (Machery-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions and then subcloned at the EcoRI site of the plasmid pBS villin promoter MES generating plasmid pBS-villin promoter MES SV40 polyA. Site directed mutagenesis was used to introduce a BsiWI site (5'phosphorylated AGCGCAGGGAGCGGCGGCCGTACGATGCGCGGCAGCGGCACG3') before the initiation codon and a MluI site (5'phosphorylated CCCGGGCCTGAGCCCTAAACGCGTGCCAGCCTCTGCCCTTGG3') after the stop codon in the full length cDNA encoding for the mouse *lama1* gene cloned in the pCIS vector (kindly provided by Pr. Peter Yurchenco, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA). The BsiWI-MluI fragment containing the *lama1* cDNA was gel purified and then subcloned in the BsiWI-MluI sites of the pBS-villin promoter MES SV40 polyA vector generating the plasmid pBS-villin promoter *lama1*.

LMα5 plasmid construct

A double strand annealed oligonucleotide, 5'GGTTTAAACATTTAAATGGTA3' and 5'CATTTAAATGTTTAAACCGTA3', was inserted into the KpnI site of the vector pBS-villin promoter MES SV40 polyA, generating the plasmid pBS-villin promoter MES KSP SV40 polyA which has now SmaI and PmeI unique sites. A double strand annealed oligonucleotide, 5'CGCGAGGCCCGGCCACCGGTGGCGCGCCA3' and 5'CGCGTGGCGCGCCACCGGTGGCCGGCT3', was inserted in the MluI site of the vector pBS-villin promoter MES KSP SV40 polyA, generating the plasmid pBS-villin promoter MES KSP MAAF SV40 polyA which have now AscI, AgeI and FseI unique sites. A double strand annealed oligonucleotide, 5'GGCCGCATTTAAATGTTTAAACCC3' and 5'GGCCGGGTTTAAACATTTAAATGTC3', was inserted in the NotI site of the vector pBS-villin promoter MES KSP MAAF SV40 polyA, generating the plasmid pBS-villin promoter MES KSP MAAF NSP SV40 polyA which have now two SmaI and PmeI sites flanking the villin promoter and the SV40 sequence.

The plasmid pGEM mTieI *lama5* contains the mouse full length cDNA encoding for the *lama5* gene was generated by Dr L. Sorokin (Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, Germany). The unique EcoRI site presents in this vector was destroyed using the T4 polymerase. Site directed mutagenesis was then used to insert a BsiWI site (5'phosphorylated CCCCAGGCCACTAGCGTACGATGGCGAAGCGCGGA3') before the initiation codon, an EcoRI site (5'phosphorylated GCGCACTCCCGGGGGGAATTCCTTCAGCCTGCACCC3') just after the signal peptide sequence and an AscI site (5'phosphorylated CCGTACTTTGGCATGGCGCGCCTTAATTAAGTGACAT3') just before the stop codon of the mouse *lama5* cDNA. A double strand annealed oligonucleotide, 5'AATTTCGGGTACCGACTACAAAGACGATGACGACAAA3' and 5'AATTTTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGGTACCCG3', containing a Flag tag sequence was then inserted into the EcoRI site. A double strand annealed oligonucleotide, 5'CGCGGGATATCCCTATGACGTCCCAGACTATGCCTAAGG3' and 5'CGCGCCTTAGGCATAGTCTGGGACGTCATAGGGATATCC3' containing a HA tag sequence and a stop codon was inserted into the AscI site. The BsiWI-AscI fragment containing the *lama5* cDNA was gel purified and inserted into the BsiWI-AscI sites of the pBS-villin promoter MES KSP MAAF NSP SV40 polyA vector generating the pBS-villin promoter *lama5* tag construct.

The functionality of the pBS-villin promoter *lama5* tag was tested by transient transfection in the HEK293 cell line. 75×10^3 cells/well in Lab-TekTM (Nunc, France) were transfected with 1µg of pBS-villin promoter *lama5* tag using JetPEI reagent (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. 24h after transfection, cell were fixed with 3% paraformaldehyde (10mn) and then with 0.5% Triton X-100 (10mn). After washing 3 times with PBS, transfected cells were incubated for 1 h at room temperature with rabbit polyclonal anti-HA antibodies diluted to 1/50 (H6908, Sigma-Aldrich, France) or mouse monoclonal anti-Flag antibodies diluted to 1/1000 (M2, Sigma-Aldrich, France). After washing in PBS (3 times) cells were incubated 1h with the secondary antibodies. Cells were examined using a Leica DMR 2 fluorescent microscope.

Mouse models, genotyping and animal experiments

Generation of Tg-lama1 and Tg-lama5 mice

Transgenic mice overexpressing the LM α 1 or the LM α 5 chain in their intestinal epithelial cells thanks to the villin promoter were generated.

The SalI fragment containing the villin promoter followed by the mouse *lama1* cDNA and the SV40 polyA from the pBS-villin promoter *lama1* plasmid was gel purified and used to inject pronuclei of fertilized oocytes prepared from the hybrid line B6D2 (C57Bl/6xDBA/2) at the transgenic facility of the IGBMC (Strasbourg, France). Germline transmission was detected by polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail DNA obtained at weaning, using the villin1 primer present in the villin promoter (5'ATAGGAAGCCAGTTTCCCTTC3') and the Ln17 primer present in the 5' region of the *lama1* cDNA (5'TGACCCAGAGCACCGAGGCCA3') generating a fragment of 152 pb. This was confirmed using the primers Ln116 present in the 3' region of the *lama1* cDNA (5'GCCTCATTCCGGGGCTGTGTG3') and SV40 3' down present in the SV40 polyA sequence (5'AATGTGGTATGGCTGATTATG3') generating a fragment of 166bp. 300 oocytes were injected giving raise to 68 living mice. Multiple generations of offspring derived from two founders expressed functional, transgene-derived LM α 1.

The SwaI fragment containing the villin promoter following by the mouse *lama5* cDNA and the SV40 polyA from the pBS-villin promoter *lama5* plasmid was purified and used to inject pronuclei of fertilized oocytes prepared from the hybrid line B6D2 (C57Bl/6xDBA/2) at the transgenic facility of the IGBMC (Strasbourg, France). Germline transmission was detected by polymerase chain reaction analysis of tail DNA obtained at weaning, using the villin2 primer (5' GGCAGGGTAGAGGTTGGACTA3') and the primer (5'TCGTCATCGTCTTTGTAGTCG3') located in the Flag tag generating a fragment of 300 bp This was confirmed using the primers Lna5s4 present in the 3' region of the *lama5* cDNA (5'CTGATCAATGGGGCCCCTGTCAAC3') and the SV40 3' down generating a fragment of 240 bp. 300 oocytes were injected at the IGBMC giving raise to 53 living mice. 13 founder lines have integrated the transgene and two were kept because of their high expression in LM α 5.

The various lines studied of Tg-*lama1* and Tg-*lama5* mice developed and bred normally without any obvious gastrointestinal defects. The expression of the *lama1* and *lama5* transgenes in the gut of adult mice was checked by Northern blot, RT-qPCR or immunodetection. All procedures with animals were performed according to INSERM ethical criteria.

Conditionally inactive mutant p53mice: note 1

Induction of colitis

Colitis was induced by providing animals with drinking water containing dextran sulphate sodium (DSS) 3% (wt/vol) for 6 days and then killed 3 days after as described previously.²⁷ To induce colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis, mice were submitted to a combined treatment of AOM (azoxymethane) and DSS.²⁸ Briefly, mice were injected intraperitoneally with 10mg/kg body weight of AOM dissolved in PBS. On the following day, DSS was administered in a cyclic fashion, with each cycle consisting of one week of 3% DSS

and one week of water. Mice received three cycles of DSS and were sacrificed 3 days after the last day of DSS treatment. The entire colon and rectum was removed, opened longitudinally, and rolled with the mucosa inwards. Histological examination and immunodetection of LMs were performed on the entire frozen samples. Inflammation was scored according to a method²⁹ taking into account the degree and extent of inflammation: overall number of inflammatory cells (scale: 0-3), epithelial damage (scale: 0-3), percentage of mucosal injury: grade 1 (1-25%), grade 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (76-100%). In total, the severity of the colitis was graded on a scale 1-10. In parallel, inflammation was determined using a Cytokine Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Briefly, distal colon samples of control and transgenic animals were removed and homogenized into cold PBS containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich, France). The concentration of protein was determined using the Bradford method. TNF- α , IL-1 β and, IL-6 were determined by ELISA assays (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. All experimental groups were tested in duplicates. Results were expressed as ng/mg of tissue.

Histology, assessment of apoptosis and senescence

For histological examination and immunohistochemical analysis, intestines were prepared by the Swiss roll method. Samples were either directly fixed in 4% paraformaldehyde or embedded in Tissue-Tek. 7 μ m sections were prepared for standard haematoxylin/eosin staining or periodic acid Schiff (PAS). For detection of apoptosis, the ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore, France) was used according to the manufacturer's guide. The Senescence Detection Kit (BioVision, CA, USA) was used to histochemically detect SA- β -Gal activity in tissue sections, a known characteristic of senescent cells. Pictures were taken using an AxioImagerZ2 microscope and acquired with the digital image AxioVision MosaiX software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany).

Immunohistochemistry, immunofluorescence

For immunohistochemistry, tissue sections of 6 μ m thickness were used. For some antibodies, tissue sections were treated with a Ventana Benchmark® automaton (Ventana Medical Systems). For other antibodies, tissue sections were deparaffinized with toluene, then boiled with the antigen retrieval sodium citrate buffer (pH6) for 10 minutes. Sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C or for 20-30 mn at 42°C for sections processed by Ventana (**Supplementary Table 1**). Slides were thereafter incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories), amplified with the ABC Elite Vectastain kit and developed with the DAB kit from Vector Laboratories. For immunofluorescence, unfixed human or mouse intestinal frozen sections of 5 μ m were incubated overnight directly with the primary antibody. List of antibodies and dilutions are listed in **Supplementary Table 1**. Bound antibodies were visualized with anti-mouse, anti-rabbit or anti-rat secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Molecular Probe) or Cy3 (Jackson ImmunoResearch, UK) or anti-mouse IgM conjugated with FITC (Sigma, Lyon France). DAPI was used to visualize nuclei. After mounting in a glycerol/PBS/phenylenediamine solution, sections were examined using an epifluorescence microscope (AX 60, Olympus Optical Co, Hamburg, Germany). Pictures were taken with an Olympus digital camera. Control sections were processed as above with omission of the primary antibodies.

RNA extraction and quantitative RT-PCR

RNA was extracted using Tri Reagent (Molecular Research Center Inc., Euromedex, France) and further purified by an additional phenol/chloroform 5/1 (V/V) extraction. The amounts of RNA were measured using a Nanodrop (ThermoScientific NanoDrop 1000).

Primer sequences are described in **Supplementary Table 2**. Total RNA was treated with DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France). cDNA synthesis was done using the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems Inc, France). For quantitative real-time PCR (qPCR) analysis, we used the LightCycler™ system (Roche Diagnostics, Meylan, France) or the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems Inc, France). PCR amplification was performed using the FastStart DNA Master Mix SYBR Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France) or using the TaqMan® Gene Expression Master mix for GAPDH or the *Power SYBR®* Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc, France). PCR efficiency (*E*) determined by serial dilution of a pool of cDNA was calculated by the slope of the regression line ($E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$) and was higher than 80%. The specificity of the PCR products was assessed by generating a melting curve. The comparative CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method) was used to quantify the cDNA of interest relative to the GAPDH reference. Data are represented as ratios of mean values (+/- SEM).

Cell cultures and p53 transfection experiments

HCT116 human colon carcinoma cells and HTC116 with a targeted inactivation of p53 (obtained from Dr Abello, Inserm U685, France) were maintained in culture at 37° C in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and gentamycin (Invitrogen Cell Culture, France). For transfection experiments, cells were plated into 6-well plates (500 000 cells per well) and transfected with 3µg of either pCMV-Neo-Bam p53 wt, pCMV-Neo-Bam p53 R175H, pCMV-Neo-Bam p53 R273H or pCMV-Neo-Bam (Addgene, Cambridge, MA) or with 3µg of plasmid pCMV6-XL5-p53 wt (Origen) or control plasmid cDNA (Invitrogen) using JetPEI™ reagent (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. A well without plasmid was also added. RNA was extracted at different time intervals (6h, 48h, 3d or 4d) after transfection. For 4d, cells were re-transfected at 3d (n=3 for each time condition).

In vitro analyses of LM influences on p53 expression and on inflammation

HCT116 cells were plated into 6-well plates coated or not with either LM-111 or Caco-2 derived LM-511 as described previously,³⁰ and RNA was extracted 48h, 72h or 96h after plating. RT-qPCR for p53 mRNA were then performed with primers mentioned in **Supplementary Table 2**. To decipher a possible LM-driven NF-κB modulation, stable NF-κB reporting HT-29 cells³¹ were seeded into 6-well control plates or into plates coated with LM-111, Caco-2 derived LM-511, human tenascin-C³² or rat tail collagen I at 5µg/cm². HT-29/Luc-E cells were cultured in RPMI 1640 medium with glutamine, 10% heat-inactivated fetal calf serum and peni-streptomycin (Invitrogen Cell culture, France) under hygromycin (200µg/ml; Invitrogen Cell culture, France) and with human TNF-α (10ng/ml; Preprotech). Luciferase activity was determined using the Luciferase Assay System (Promega, France) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the one sample t-test (GraphPad software) to verify significance of the observed differences.

Results

Changes in epithelial BM structure in IBD

A comprehensive analysis of LM molecules in human colon samples from both CD and UC patients was conducted to identify which LM chains might be deregulated in IBD. Results regarding the expression/location of LMs at the epithelial BM in IBD and control mucosa are summarized in **Supplementary Figure 2**. In normal colon mucosa, the $\alpha 1$ chain was not detected at the BM level whereas in inflamed CD and UC specimens an induction in its expression was found in sporadic clusters of glands and restricted to the crypt bottom (**Supplementary Figure 3B**). In addition, a significant up-regulation of the $\alpha 5$ chain was also observed in the crypts of inflamed tissues (**Supplementary Figure 3D**). These modifications were noted in inflamed ileal mucosa for LM $\alpha 5$ chain as shown using the 4C7 antibody formerly postulated to recognize LM $\alpha 1$ chain.^{16,20} There was no significant difference in the BM staining for other LM chains studied ($\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$) between IBD and normal samples while gradient of LM $\alpha 3$ and LM $\gamma 2$ staining was less pronounced in IBD (not shown). The biological effects of the LMs are mediated by surface receptors including integrins and non-integrin receptors such as dystroglycan (Durbeej, 2010). In inflamed tissues, $\alpha 6\beta 4$ integrin known to bind LM $\alpha 1$, LM $\alpha 3$ and LM $\alpha 5$ chains was increased in crypt bottom while integrin $\beta 1$ subunit and dystroglycan expression did not vary between normal and inflamed samples (not shown).

Tenascin-C (TN-C), defined as an anti-adhesive molecule was found in intestine in a sub-epithelial position (**Supplementary Figure 3E**). Accordingly to previous data (Riedl et al. 1992), TN-C immunoreactivity was increased at the mucosal surface and in the lamina propria especially in the UC samples (**Supplementary Figure 3F**). TN-C accumulation in the mucosa is correlated with increased numbers of endothelial and smooth muscle cells as determined by CD31 and α -smooth muscle actin immunoreactivity (not shown).

LM accumulation is found around the ulceration-associated cell lineage

In the mucosa adjacent to ulcers, small atypical buds were often visible in CD and UC samples (**Figures 1A and 2**). Although often located near the muscularis mucosae, they can be found scattered within the mucosae. They were identified by Wright et al.³³ as a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage possibly capable to stimulate ulcer healing throughout the gut in CD patients and called UACL for ulcer associated cell lineage. The UACL were positively stained using periodic acid Schiff (**Figure 1A**) and were detected in all colon CD and UC cases. UACL glands are often clustered and composed of epithelial cells with pale staining with hematoxylin/eosin, small flat nuclei situated horizontally along the basal poles of cells (**Figures 1A and 2**). We investigated the immunohistochemical expression of gastrointestinal mucins and of trefoil peptides (**Figure 1B**) assumed to define UACL glands.^{34,35} These glands are positive for MUC5AC and MUC6. No immunoreactivity was found for the homeobox gene Cdx-2 or for MUC2, one of its target genes. TFF3 peptide is expressed in goblet cells in the normal colon but absent from the UACL glands. TFF1 antigen was detected in CD samples in regions adjacent to mucosal ulcerations; yet, it was absent from UACL glands.

Immunostaining of BM molecules clearly show that the UACL glands are strongly stained by LM $\alpha 1$ and LM $\alpha 5$ antibodies and to a lesser extent with LM $\alpha 3$ antibodies (**Figure 2**). No clear modifications in intensity/distribution were seen for LM $\alpha 2$ and LM $\alpha 4$ and for the LM β and γ chains studied compared to normal glands (**Figure 2 and not shown**). The epithelial

cells within the UACL that were surrounded by LM α 1 and LM α 5 chains at the BM level strongly expressed the α 6 β 4 integrin receptor (**Figure 2F**).

Transgenic animal models for IBD are less affected by DSS treatment

To assess whether LMs regulate inflammation responses in the intestinal epithelium, we generated transgenic mice that overexpress LM α 1 or LM α 5 in the gut. A series of independent lines of transgenic mice were obtained that had inserted a transgene containing *lama1* or *lama5* cDNA under the intestinal-specific villin promoter.²⁶ The exogenous expression of the α 1 chain protein in the colon as well as the ectopic expression of the α 5 chain in the bottom of the crypt region was confirmed by immunostaining (**Supplementary Figure 4**).

Adult transgenic and wild-type (wt) mice were submitted to the pro-inflammatory reagent DSS leading to the development of inflammation. Animals treated with DSS presented signs of diffuse colonic inflammation (**Figure 3A**). Three distinct areas could be observed along the swirl-roll of the colon: (1) areas that correspond to strong signs of ulceration with distorted crypts, abundant stroma and important infiltration of lymphocytes and macrophages, (2) region of mild inflammation where the normal colonic mucosa was partly preserved or is in a regenerative state and (3) non inflamed mucosa. Regions of inflammation were also confirmed by tenascin accumulation in the mucosa (not shown). Immunodetection of LM α 1 and LM α 5 chains showed consistently an increase in their expression at the subepithelial basement membrane when animals were submitted to DSS as compared to untreated animals (**Figure 3A and B**). This corroborates the *in vivo* findings on MICI samples: induction of LM α 1 and ectopic expression of LM α 5 with a preferential expression at the bases of the colonic crypts (**Supplementary Figure 3**). Administration of DSS to Tg-*lama1* mice further increased the LM α 1 staining as compared to the DSS-treated wt animals with an expression which reached approximately 2/3 versus 1/2 of the glands (**Figure 3B**). No further increase in LM α 5 staining could be noted in Tg-*lama5* colonic mucosa treated with DSS compared to the DSS-treated wt animals due its high level of expression in basic conditions (**Figure 3B**).

Histological grading of colitis was performed as described in Materials and Methods to evaluate the possible differential susceptibility to DSS according to LM expression found in the colon. The mean scores assessed on the entire colon and on rectum are 6.8 for wt-*lama5* mice (n=5), 4.2 for Tg-*lama5* (n=5), 6 for wt-*lama1* (n=3), and 3.7 for Tg-*lama1* (n=3). Taking into account the final scoring, it can be concluded that inflammation was attenuated in the transgenic animals whatever they express LM α 1 or LM α 5 chain.

Note 2

Cells of the UACL present p53 immunoreactivity

As colorectal cancer can arise from colitis¹ we performed immunohistochemistry of p53 in human CD and UC colonic samples using the DO-7 antibody. This antibody was shown to have the highest sensitivity and specificity for the detection of genetic mutations in colorectal cancer.¹⁰ Most of the histologically normal epithelium displayed p53-negative cells. Yet, some colonic glands in CD or UC inflamed segments presented cells with an accumulation of nuclear p53 staining of weak intensity (not shown). p53 immunoreactivity differed significantly in regions where UACL glands were detected. Indeed, the nuclei of the atypical gland cells were strongly p53 positive (**Figure 4A, B**). In addition, some glands found nearby the UACL presented sporadic p53 nuclear staining (**Figure 4A**; arrowheads). Yet, in general a clear boundary between p53 positive and negative glands was observed. β -catenin staining

was performed in parallel on the samples from IBD patients. A lateral cell membrane staining was seen in the majority of epithelial cells whatever their location in colonic or in UACL glands, although weaker in the latter case (**Figure 4C**). Of note is the fact that a β -catenin nuclear staining only confined to cells within the UACL glands could be observed in some CD cases (**Figure 4D**). E-cadherin immunoreactivity was found in both normal and UACL glands delimitating nicely the cell/cell junctions (**Figure 4E**); yet in the UACL glands this staining was restricted to the base of the epithelial cells (**Figure 4F**).

Neither LM-111 nor LM-511 activates p53 mRNA or inflammation

To test whether LM substrata could modulate endogenous p53 transcripts, HTC116 cells were seeded on LM-111 or LM-511-enriched matrix. **Figure 5A** shows that p53 mRNA could not be stimulated by the presence of LMs as compared to cells seeded on plastic as assessed by RT-qPCR and whatever the time period studied (from 2 to 4 days). To test the possible activation of LMs or of other matrix substrata in inflammatory conditions, we used a stable NF- κ B reporter model in human colorectal HT-29 cells. In basal conditions without matrix substratum, TNF- α was able to induce expression of the reporter gene reaching a mean of ~4-fold stimulation after 6 h of TNF α treatment (**Figure 5B**). No further effect on the reporter system was observed when the cells were seeded on matrix molecules including LM-111 and LM-511 (**Figure 5B**).

Induction of endogenous *lama1* by TP53 in a human tumor cell line – Note 3

To examine whether ectopic expression of wild-type TP53 could result in increased expression of endogenous *lama1* mRNA in human cells, the human HCT-116 colorectal cell line was transfected with the TP53 gene. **Figure 5C** shows that expression of *lama1* mRNA in HCT-116 cells was increased by 2.2 fold as early as 6 h ($p=0.013$) and by 2.8 ($p=0.0002$) at 48h after transfection with pCMV-p53wt as compared to cells transfected with control plasmid. This study conducted at different time periods up to 4 days showed an inducibility increasing with time. Interestingly, *lama3*, *lama5*, *lamb1* and *lamc1* mRNA levels were not modified by p53 overexpression as visualized after 48h (**Figure 5C**).

***Lama1* promoter activity – Note 4**

p53 accumulation and loss of MUC2 also occurs in animal models – Note 5

The possible relationship between p53 and LM α 1 was then tested using animal models for IBD and IBD-associated colorectal cancer. Adult mice were submitted to the DSS or the combined AOM/DSS treatment leading to the development of inflammation-driven colorectal tumors.²⁸ At early phases of inflammation characterized by ulcerated surface epithelium and structurally normal or regenerative glandular crypts, p53 immunoreactivity was found strongly expressed in nuclei of numerous colonic epithelial cells (**Figure 6A**). With the combined AOM/DSS treatment, neoplastic regions developed progressively in the inflamed mucosa of Tg-*lama1* mice (3 out of 5 versus 1 out of 5 for control mice). Various types of lesions were found on the intestinal Swiss roll of treated animals: regions with concomitant presence of intense ulceration and reparative zones (**Figure 6B and C**), and regions with neoplastic lesions (**Figure 6D and E**). Similarly to data obtained with DSS, AOM/DSS wt intestines were in a more inflamed state than those from transgenic mice (Tg-*lama1* and Tg-*lama5*) as assessed by the histological inflammatory score, being respectively of 6.3 ($n=8$) and 4.4

(n=9). Co-staining experiments of LM α 1 and p53 revealed that the p53 immunoreactivity tended to disappear, concomitantly to the increase in LM α 1 intensity suggesting that p53 accumulation is the first event before LM α 1 activation (**Figure 6B and D**). Furthermore, MUC2 disappeared from the p53-positive glands (**Figure 6C**) as in the UACL observed in human IBD cases (**Figure 1B**). Nuclear p53 accumulation and loss of MUC2 staining were also observed in the tumors (**Figure 6E**).

Acknowledgments

CS was a recipient of fellowships from the French Ministry of Research and Education and the Ligue contre le Cancer. We would like to thank Pr. Peter Yurchenco (Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA) for full length cDNA encoding mouse *lama1* gene and H. Blottière (INRA, UMR 1319, Jouy-en-Josas, France) for the NF- κ B reporter HT29 clone. We also thank JH Miner (Washington University School of Medicine, Saint-Louis, Missouri, USA), P Rousselle (IBCP, Lyon), E. Engvall (The Burnham Institute, La Jolla, USA), C. Tomasetto (IGBMC, Illkirch, France), KP Campbell (Howard Hughes Medical Institute, Iowa City, USA), R Chiquet-Ehrismann (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland), J Bara (INSERM UMR S-938, Paris, France) for antibodies. We thank C. Arnold for their expert technical assistance for cell culture and tissue dissociation. We thank M. and P. Lavogez, and F. Wack for animal care. PSA and GO obtained support from the Association pour La Recherche sur le Cancer, Institut National contre le Cancer, and the Hautepierre Hospital, Strasbourg (GO).

Reference List

1. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:378-389.
2. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, et al. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:376-388.
3. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526-535.
4. Jess T, Gamborg M, Matzen P, et al. Increased Risk of Intestinal Cancer in Crohn's Disease: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2724-2729.
5. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell* 2010;140:859-870.
6. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2004;126:1634-1648.
7. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;107:369-378.
8. Yoshida T, Mikami T, Mitomi H, et al. Diverse p53 alterations in ulcerative colitis-associated low-grade dysplasia: full-length gene sequencing in microdissected single crypts. *J Pathol* 2003;199:166-175.
9. Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, et al. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 2009;136:542-550.
10. Lashner BA, Shapiro BD, Husain A, et al. Evaluation of the usefulness of testing for p53 mutations in colorectal cancer surveillance for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:456-462.
11. Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1101-1110.
12. Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 2009;3:287-310.
13. Yurchenco PD, Patton BL. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* 2009;15:1277-1294.
14. Katz E, Streuli CH. The extracellular matrix as an adhesion checkpoint for mammary epithelial function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007;39:715-726.
15. Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res* 2010;339:259-268.

16. Teller IC, Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-18.
17. Simon-Assmann P, Spenle C., Lefebvre O, M.Kedinger. The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. In: Conn P.M. and Kaestner K., eds. Academic Press, 2010.
18. Perreault N, Herring-Gillam FE, Desloges N, et al. Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248:121-126.
19. Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, et al. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:39-48.
20. Bouatrouss Y, Herring-Gillam FE, Gosselin J, et al. Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* 2000;156:45-50.
21. Korhonen M, Ormio M, Burgeson RE, et al. Unaltered distribution of laminins, fibronectin, and tenascin in celiac intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1011-1020.
22. Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, et al. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000;4:1-11.
23. Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulios P, et al. Serum laminin and collagen IV in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003;56:817-820.
24. Francoeur C, Escaffit F, Vachon PH, et al. Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G592-G598.
25. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991;32:174-178.
26. Pinto D, Robine S, Jaisser F, et al. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem* 1999;274:6476-6482.
27. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007;2:541-546.
28. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2007;2:1998-2004.
29. Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-391.

30. Turck N, Gross I, Gendry P, et al. Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research* 2005;303:494-503.
31. Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, et al. Functional Metagenomics: A High Throughput Screening Method to Decipher Microbiota-Driven NF- κ B Modulation in the Human Gut. *PLoS ONE* 2010;5:e13092.
32. Lange K, Kammerer M, Hegi ME, et al. Endothelin Receptor Type B Counteracts Tenascin-C-Induced Endothelin Receptor Type A-Dependent Focal Adhesion and Actin Stress Fiber Disorganization. *Cancer Res* 2007;67:6163-6173.
33. Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 1990;343:82-85.
34. Wright NA, Poulsom R, Stamp G, et al. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1992;193:76-82.
35. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, et al. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800.

Figures

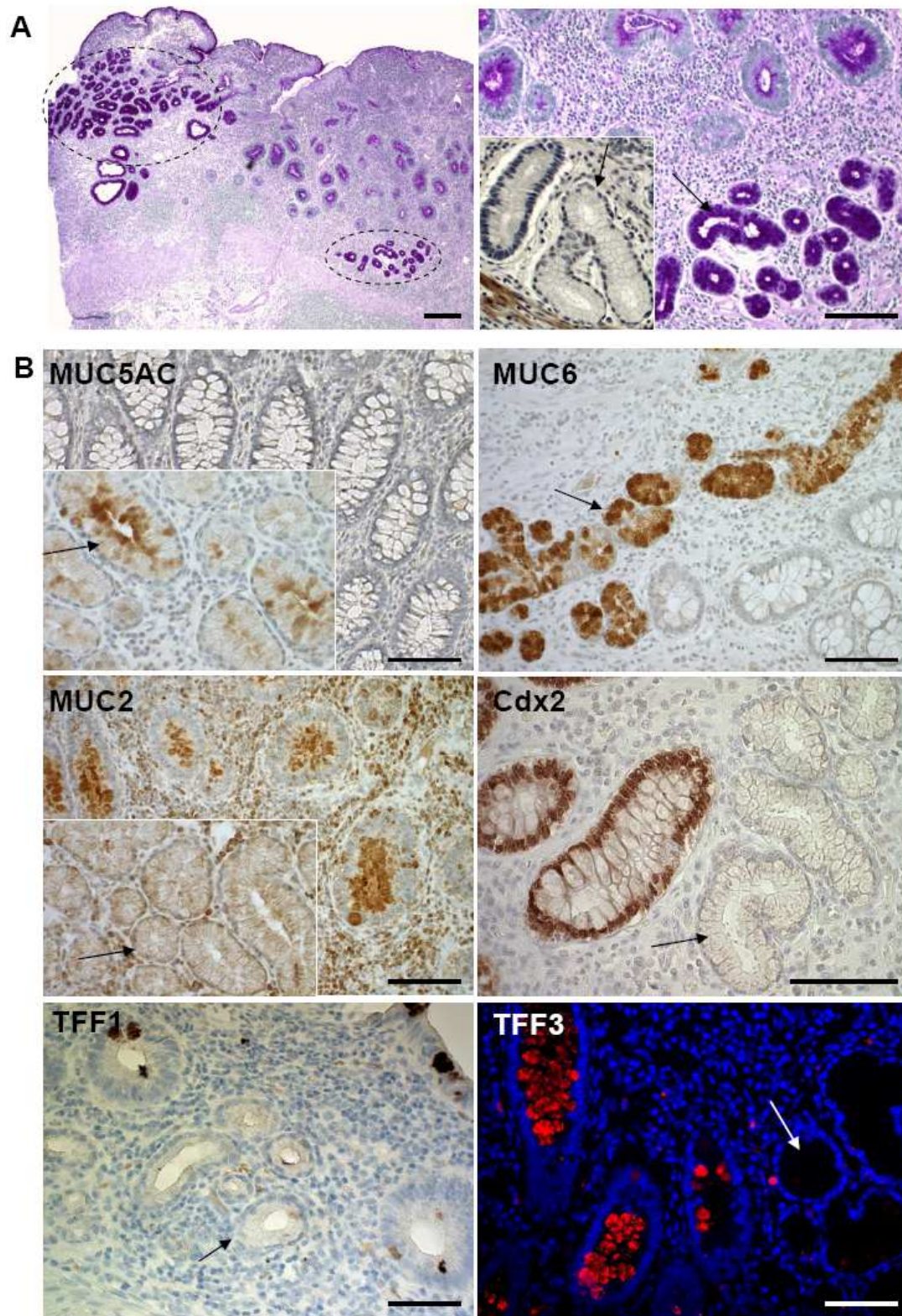


Figure 1: Characteristic features of the UACL found in IBD patients

(A) The UACL were identified as glandular structures strongly stained in magenta with PAS as compared to the normal colonic glands; they were characterized by elongated flat nuclei at the basal pole of the cell (inset; staining with hematoxylin-eosin; arrow). (B) The cells that composed the UACL showed immunoreactivity for MUC5AC (inset) and MUC6, while no reactivity was observed for MUC2 or Cdx2 as compared to normal colonic areas; TFF1 and TFF3-reactive cells were not found in the UACL. Nuclei are visualized with DAPI. Arrows point to the UACL. Scale bars: 50 μ m

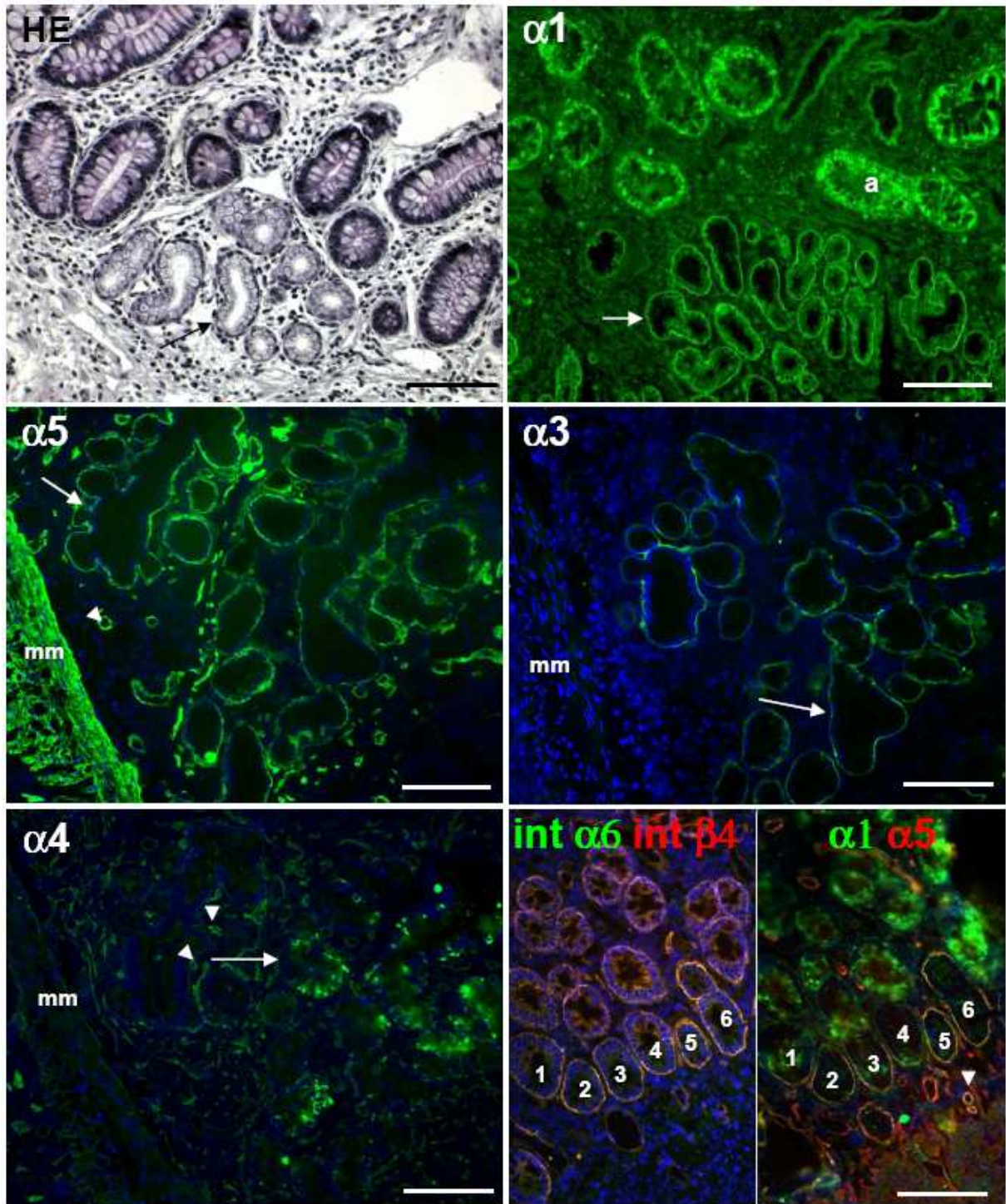


Figure 2: Immunodetection of LM α chains and integrin α 6 β 4 in UACL

The UACL glands identified by differential hematoxylin-eosin staining (HE) are surrounded by a strong staining for LM α 1, LM α 5 and to a lesser extent for LM α 3 chain. Some aspecific LM α 1 staining (a) was trapped by mucus in goblet cells. LM α 4 immunoreactivity was very weak around the UACL as in control glands; staining was found in blood vessels. The epithelial cells from the UACL glands (numbered 1 to 6) are co-stained (merged yellow signal) with anti- α 6 integrin (green) and anti- β 4-integrin (red) antibodies and correspond to those stained by both anti-LM α 1 and anti-LM α 5 chains. Nuclei are visualized with DAPI. Arrows point to the UACL; arrowheads: vessels; mm: muscularis mucosae. Scale bars: 50 μ m

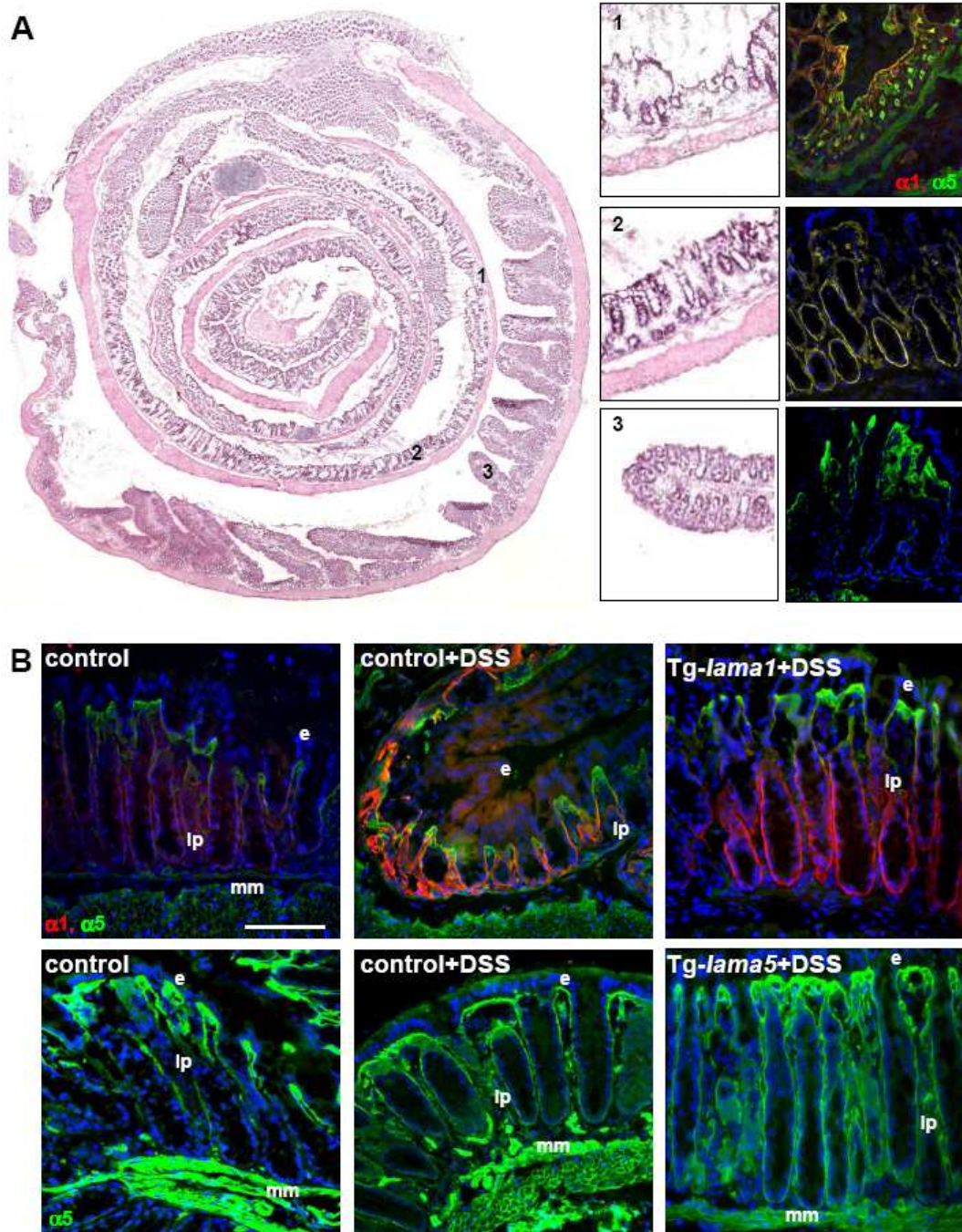


Figure 3: LM α 1 and LM α 5 expression in transgenic mouse models for inflammation

(A) Representative picture (hematoxylin-eosin staining) of a swiss-roll of colon and rectum from a *tg-lama5* mouse treated with DSS; the colon is located on the external part of the swiss-roll, while the rectum is in the center. (1-3) enlargement of representative zones found along the swiss-roll: (1) area corresponding to strong signs of ulceration with distorted crypts in which there is accumulation of LM α 1 (red) and LM α 5 (green) in the stroma; (2) region of mild inflammation where the normal colonic mucosa is partly preserved showing increased LM staining in crypt regions (merged yellow signal); (3) non inflamed mucosa showing the typical LM α 5 staining at the upper part of the gland with absence of LM α 1. (B) Immunodetection of LM α 1 (red) and LM α 5 (green) chains on cryosections of control colonic mucosa, of colon from DSS-treated mice and from either *Tg-lama1* or *Tg-lama5* mice submitted to DSS. Note the enlargement of the BM region that is stained for LM α 1 or LM α 5 when mice are treated with DSS. e: epithelial cells; lp: lamina propria; mm: muscularis mucosae. Nuclei are visualized with DAPI. Scale bar: 50 μ m

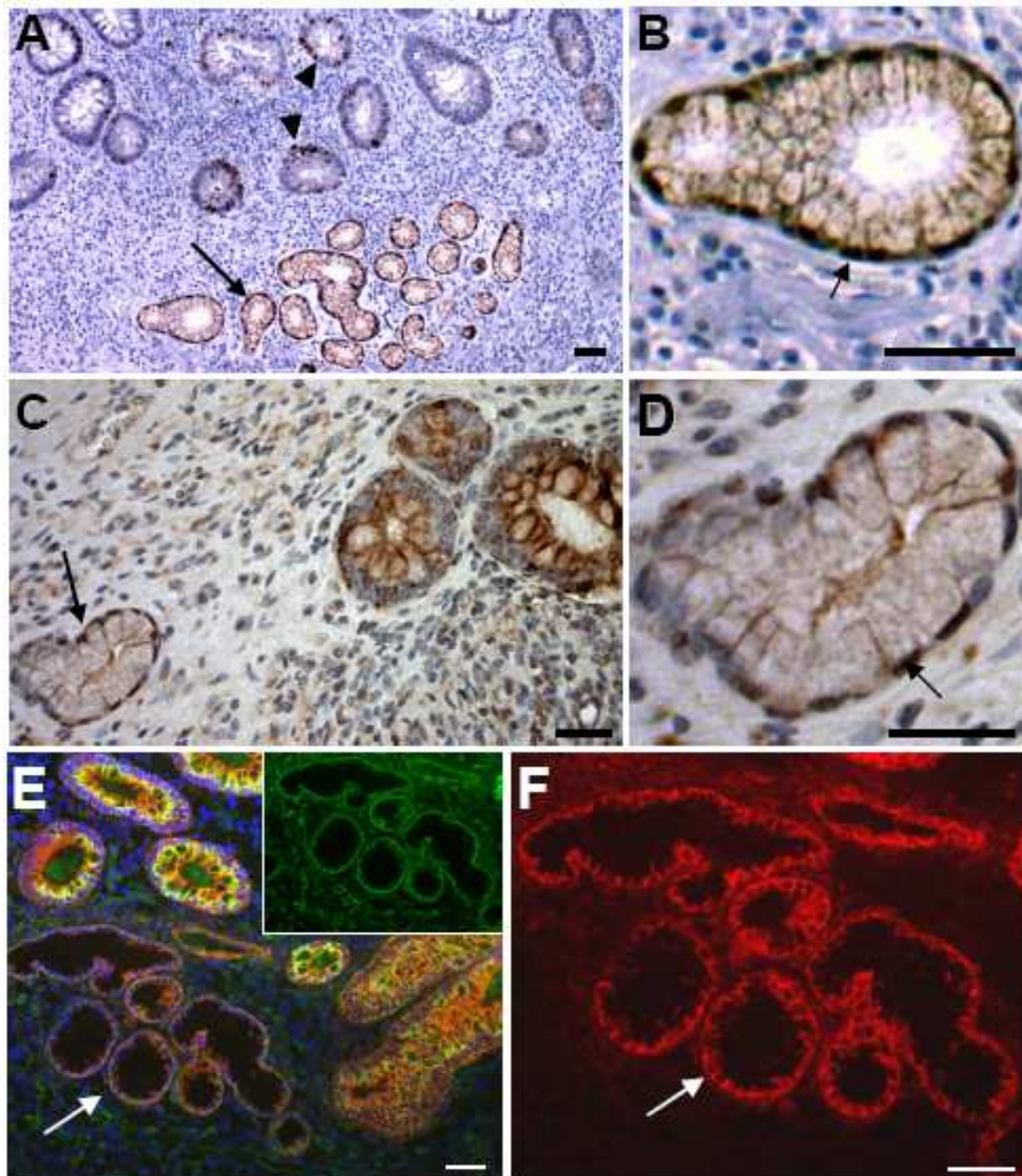


Figure 4: UACL glands present p53 and β -catenin immunoreactivity

(A, B) The nuclei of all epithelial cells found in the UACL from IBD patients were positive for p53 as shown by immunostaining with anti-DO-7 antibody. The nuclei of adjacent crypts that are morphologically different from UACL present some p53-positive cells scattered within the glands (arrowheads) or were negative. (C, D) Immunostaining for β -catenin showing that almost all cells found in the UACL presented a nuclear reactivity contrasting with the confined lateral cell/cell junction staining in adjacent epithelial cells. (E) Co-staining experiments (merged yellow signal for E-cadherin in red and LM α 1 chain in green) showing that the UACL glands defined by the strong immunoreactivity with anti-LM α 1 antibodies still exhibited E-cadherin at the lateral junction of cells; this staining was restricted to the basal pole of cells in UACL (F) as compared to adjacent normal cells. (B), (D) and (F) are higher magnification of (A), (C) and (E) respectively. Nuclei in (E) were visualized with DAPI. Arrows point to the UACL. Scale bars: 50 μ m

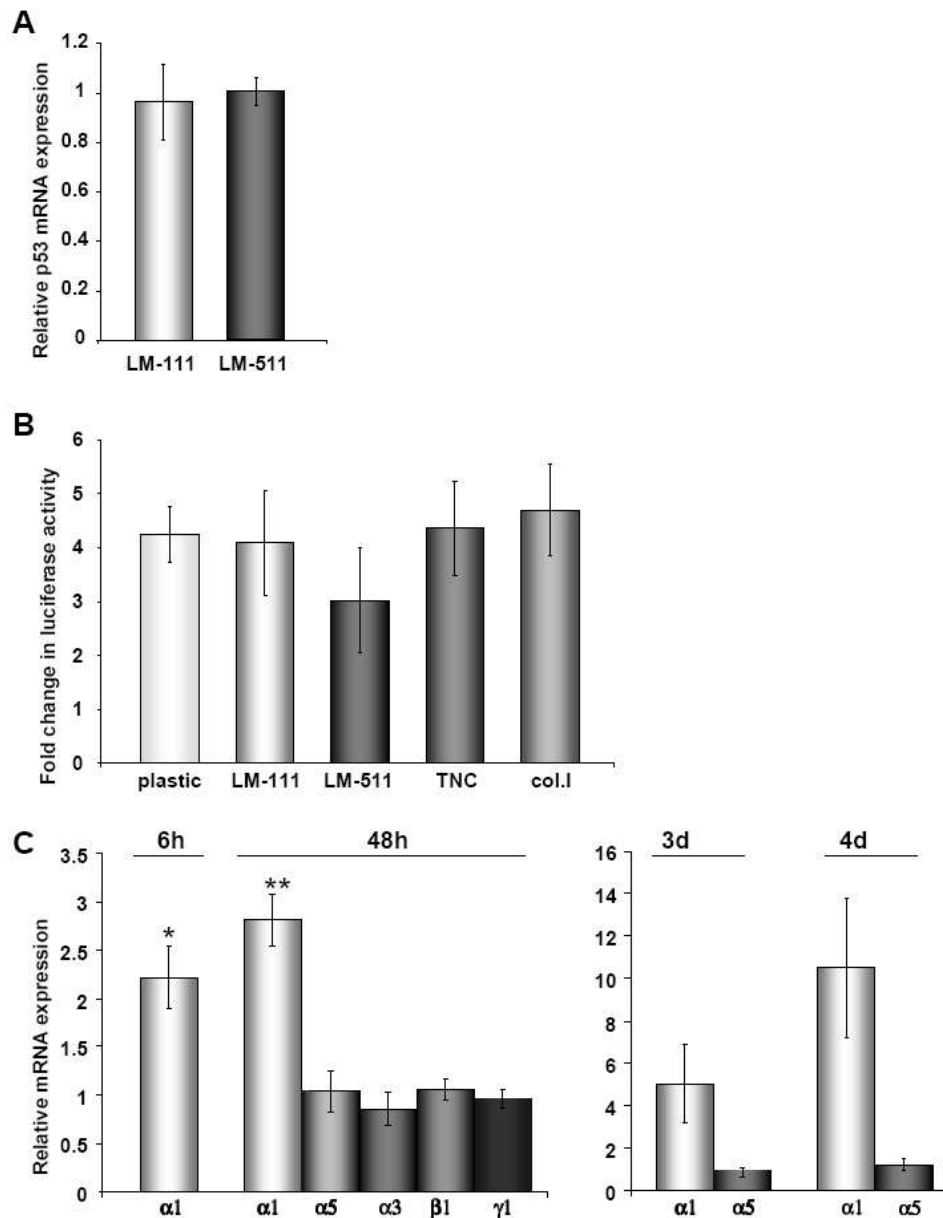


Figure 5: p53 expression controls LM α 1 expression in human colonic cancer cells

(A) HCT116 cells were seeded either on LM-111 or on LM-511-enriched matrix; endogenous p53 mRNA was quantified by qRT-PCR and expressed as ratio relative to controls (plastic dishes). The values are given as a mean \pm SEM of 9 independent experiments (n=3 at 2 days; n=3 at 3 days; n=3 at 4 days) which were pooled. Data show that LM substrata do not activate endogenous expression of p53 in cells. (B) NF- κ B reporting HT-29 cells were cultured with or without TNF α on different matrix substrata and compared to dishes without matrix (plastic). The values are given as fold change in luciferase activity (ratio with TNF α / without TNF α ; mean \pm SEM from 3 independent experiments). Data show that activation of the reporter gene assessed by luciferase activity was not modified by LMs in particular. (C) Relative mRNA expression of various LM constitutive chains in HCT116 cells following transfection with TP53 gene assessed at different time points (6h, 48h, 3 and 4 days). Transcript levels were determined by RT-qPCR and standardized for GAPDH mRNA, and the values are given as ratios normalized to those founding cells transfected with the vector alone (means \pm SEM from 3-4 experiments, except for $\alpha 1$ at 6h n=6 and at 48h n=8). Data show that wild-type p53 activates selectively and progressively the endogenous expression of LM α 1 mRNA. *: p = 0.013; **: p=0.0002.

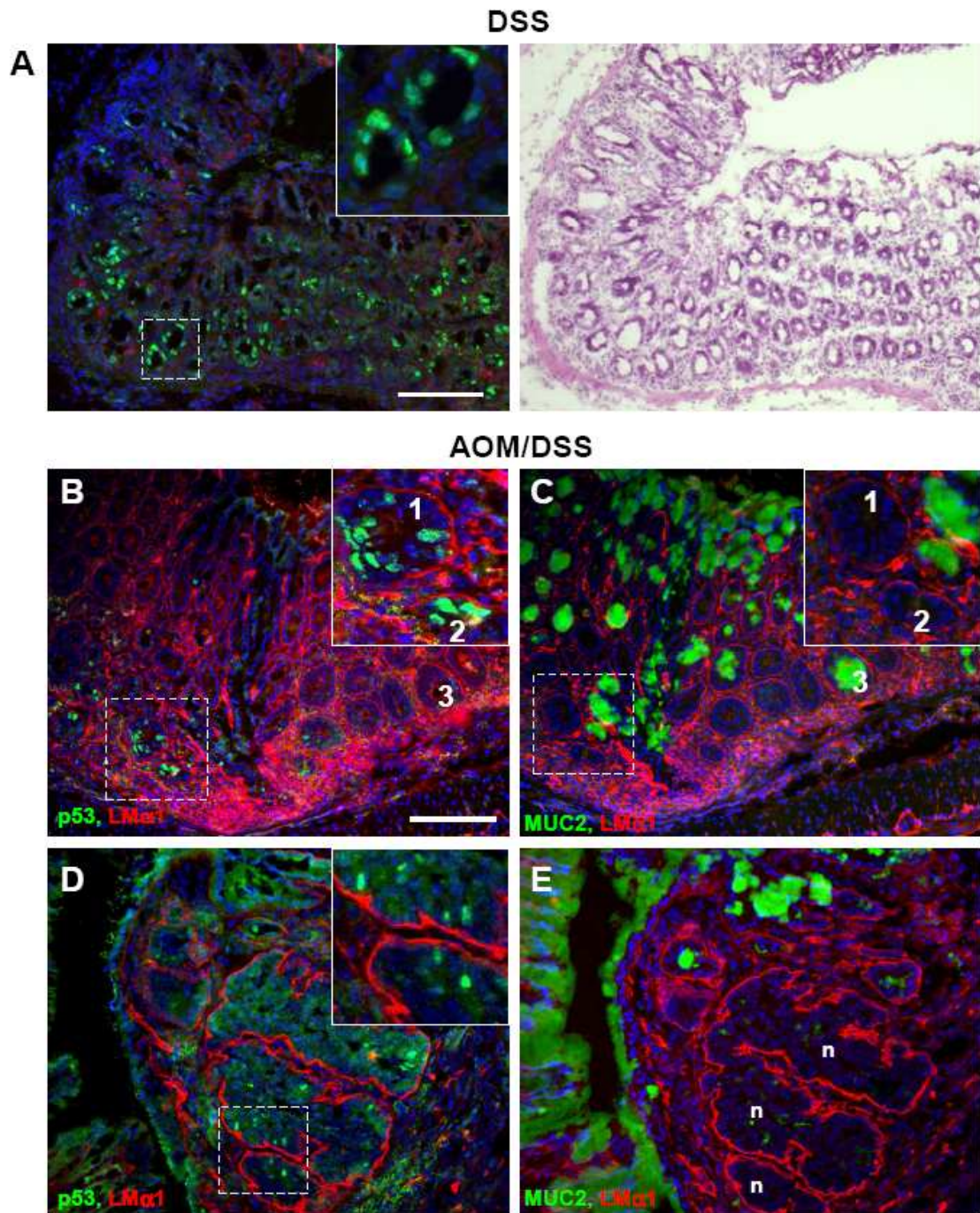
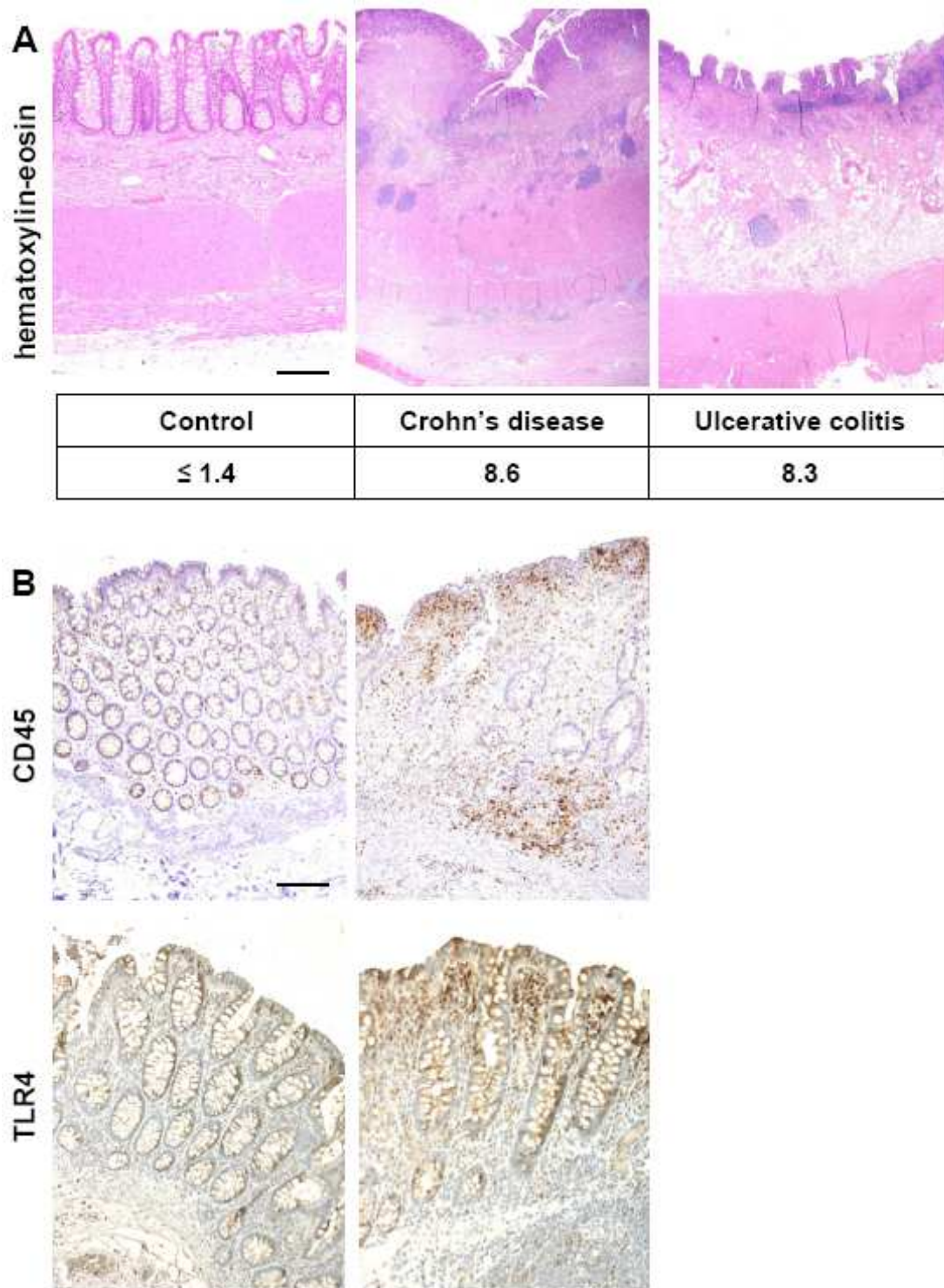
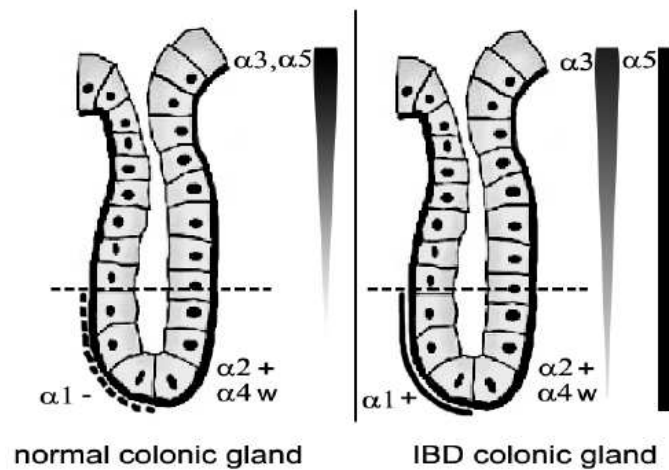


Figure 6: p53 accumulation occurs in animal models for colitis and for inflammation-mediated colorectal carcinogenesis

(A) p53 expression (green) and LM α 1 staining (red) on a colonic sample from a DSS-treated mouse presenting mild inflammation with an ulcerated surface epithelium and structurally normal or regenerative glandular crypts; p53 immunoreactivity was present in numerous nuclei within epithelial cells; inset: representative area showing the nuclear p53 staining; right: the corresponding cryo-section was stained with hematoxylin-eosin; (B) and (C) Co-staining experiments for p53 (green) and LM α 1 (red) (left panels), or MUC2 (green) and LM α 1 (red) (right panels) on inflamed regions of a wt mouse (B, C) and on a neoplastic lesion from colonic mucosa from a *Tg-lama1* mouse submitted to the AOM/DSS treatment (D, E) (adjacent sections). In inflamed tissue (B, C), while LM α 1 staining (red) became intense at the BM level, p53 staining was still present and MUC2 was lost (eg, glands 1 and 2); gland 3 represents possibly a gland in a more advanced regenerative process devoid of p53 staining and positive for MUC2. In tumors (D, E), p53 was also found in some epithelial cells of the neoplastic area; in parallel, MUC2 expression decreased or was undetectable in this region (n). Nuclei were visualized with DAPI. Scale bars: 50 μ m.

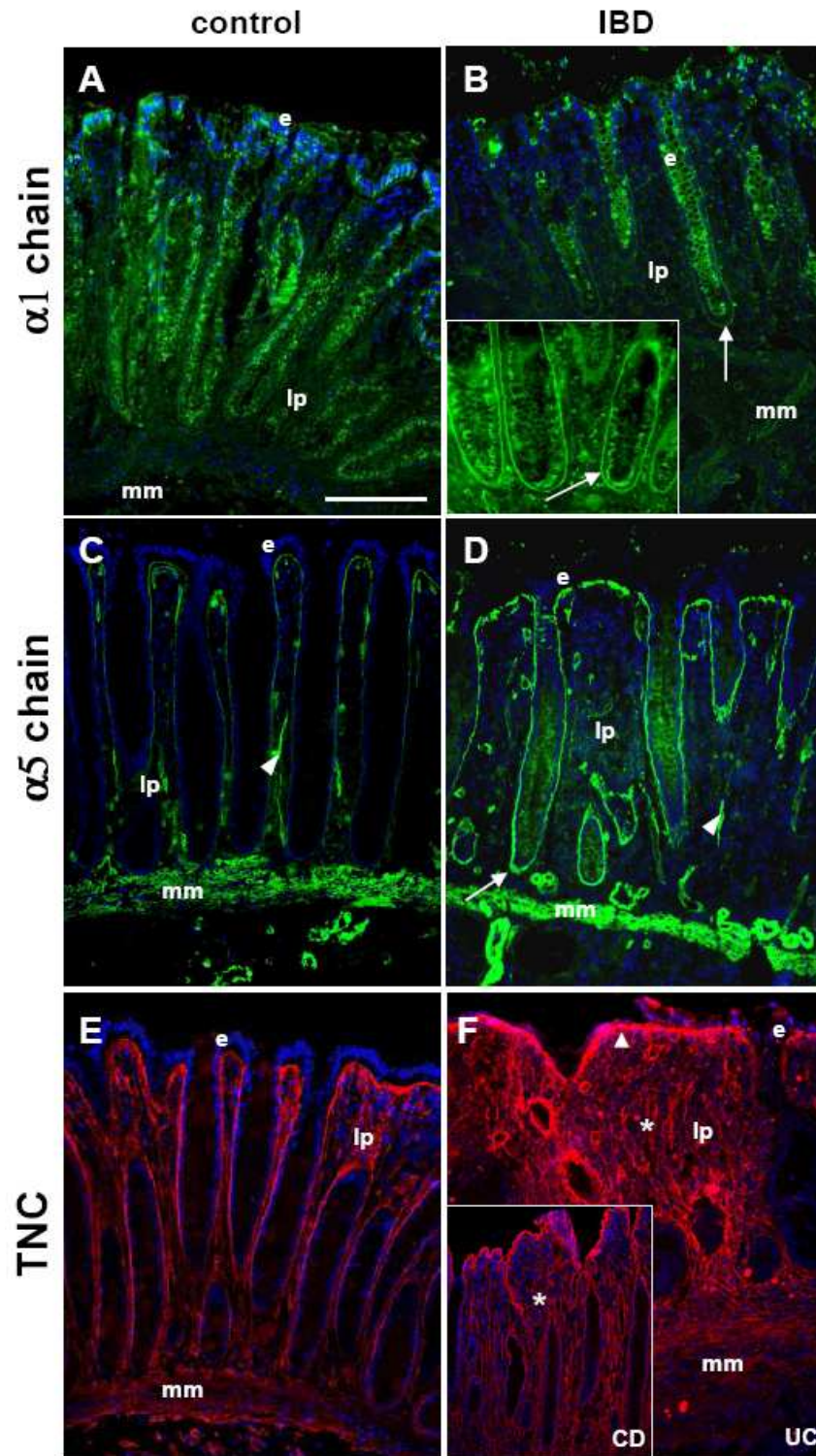


Supplementary Figure 1: Assessment of the inflammatory scores in Crohn's disease and ulcerative colitis
 (A) The macroscopic appearances of the mucosa after hematoxylin-eosin staining were graded using the Riley's score²⁵ on 15 Crohn patients and 7 Ulcerative colitis patients giving a mean value ranging from 8.3 to 8.6 while control samples never exceeded 1.4 (B) Inflammation was further confirmed by immunohistochemistry showing strong CD45 and TLR4 reactivity in samples from CD patients. Scale bars: 25 μ m



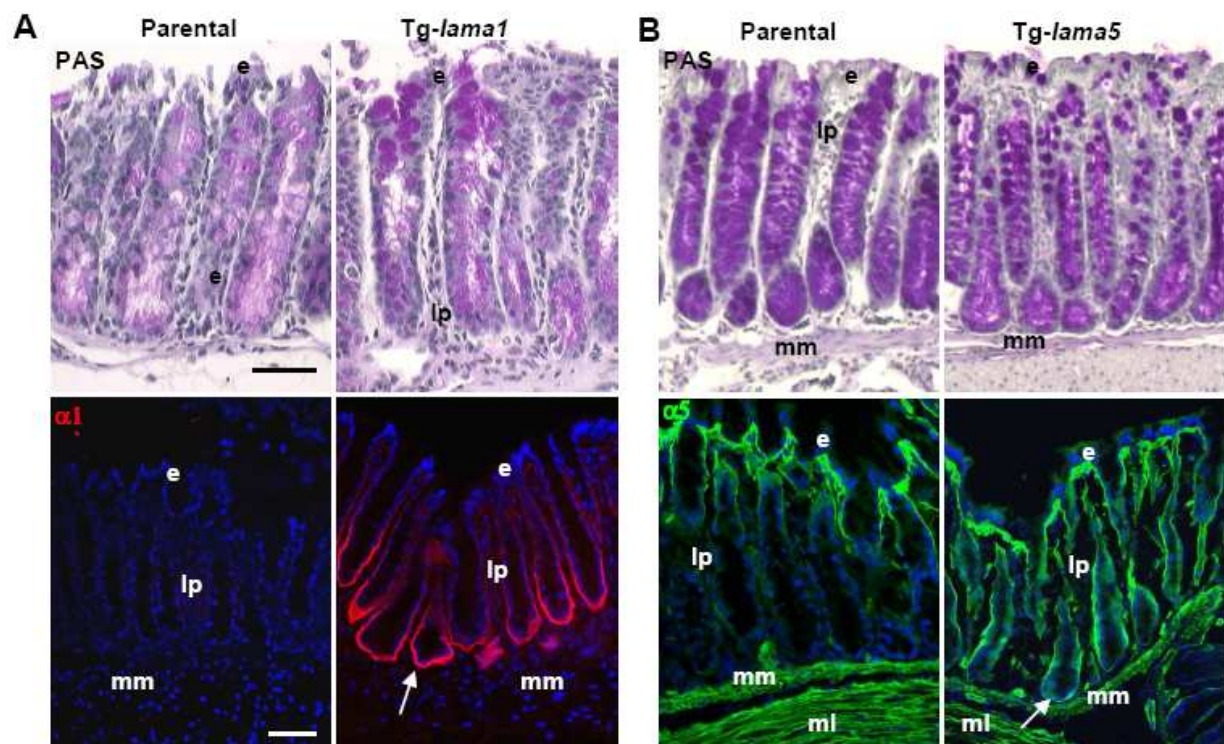
Supplementary Figure 2: Diagram summarizing the distribution of LM α chains in normal (left) and IBD (right) colonic mucosa

LM $\alpha 3$ and LM $\alpha 5$ chains were found more concentrated at the top of the normal colonic glands while in IBD their expression extended down to the crypt, leading to a homogenous distribution of LM $\alpha 5$ along the crypt-villus axis. LM $\alpha 1$ chain was induced in colonic crypt from IBD patients while expressions of LM $\alpha 2$ and LM $\alpha 4$ chains (w: weak) were not modified. Note that only the epithelial basement membrane is depicted and expression in lamina propria is omitted for clarity; w: weak



Supplementary Figure 3: Modifications in expression of LM α 1, LM α 5 chains and in TNC in IBD colonic mucosa

(A-B) LM α 1 chain is detected selectively at the BM at crypt bottom in IBD samples (B; arrows) and is lacking in normal mucosa (A); some unspecific cytoplasmic immunoreactivity is seen in goblet cells. (C-D) Immunostaining for LM α 5 in IBD samples is extended along the colonic glands with a strong staining at the deeper crypt region (D) contrariwise to normal colon (C) where the staining presented an increasing gradient of distribution. (E-F) TNC content was heavily increased at the BM level (arrowhead) and in the lamina propria (asterisk) in colonic mucosa from UC and CD (inset) patients (F versus E). e: epithelial cells; lp: lamina propria; mm: muscularis mucosae; arrows: ectopic staining at crypt bottom; arrowheads: myofibroblasts. Scale bar: 50 μ m



Supplementary Figure 4: Expression of the *Tg-lama1* and *Tg-lama5* genes in the colon

(A-B) Histological views of colons from parental and the *Tg-lama1* and *Tg-lama5* transgenic animals (stained with PAS). Expression of LM α 1 (A) and LM α 5 (B) proteins was visualized by immunostaining in transgenic animals overexpressing the *lama1* and *lama5* genes and compared to the normal parental colon. This showed that both chains are ectopically expressed in the glandular crypt region in transgenic animals (arrows). Nuclei are visualized with DAPI. e: epithelial cells; lp: lamina propria; mm: muscularis mucosae; ml: muscle layers. Scale bars: 25 μ m

specificities	species	antibody name	source	dilution	staining
Laminin α 1	rabbit anti-human	α 1 G4/G5	Dr D Gullberg	1/400	IF
Laminin α 1	rat anti-mouse	200	Dr L Sorokin	1/100	IF
Laminin α 2	mouse anti-human	2D10/E7	Dr E Engvall	1/50	IF
Laminin α 3	mouse anti-human	BM2	Dr P Rousselle	1/100	IF
Laminin α 4	mouse anti-human	3D12	Dr L Sorokin	pure	IF
Laminin α 5	mouse anti-human	4C7	Dr E Engvall	1/100	IF
Laminin α 5	rabbit anti-mouse	405	Dr L Sorokin	1/500	IF
Laminin β 1	mouse anti-human	IID9	Dr L Sorokin	pure	IF
Laminin β 2	mouse anti-human	9F8	Dr L Sorokin	pure	IF
Laminin γ 1	mouse anti-human	IID10	Dr L Sorokin	pure	IF
Laminin γ 2	rabbit anti-human	2140	Dr P Simon-Assmann	1/1000	IF
Integrin α 6	rat	GoH3	Immunotech	1/50	IF
Integrin β 4	mouse	1964-3E1	Euromedex	1/1000	IF
Integrin β 1	mouse anti-human	P4C10	Gibco BRL	1/1000	IF
Dystroglycan	mouse anti-human	IIH6	Dr KP Campbell	1/200	IF
Lutheran	rabbit	CyLu	Dr JH Miner	1/500	IF
TNC	rabbit	TNC 1.2	Dr G Orend	1/200	IF
TNW	mouse	560	Dr R Chiquet-Ehrismann	1/500	IF
FN	rabbit	FN 2.1	Dr G Orend	1/200	IF
Muc2	rabbit	1A + 2B Muc2	Dr J Bara	1/200	IHC
Muc5AC	mouse	PM9	Dr J Bara	pure	IHC
Muc6	mouse	F8	Dr J Bara	pure	IHC
TFF1	mouse	P2802	Dr C Tomasetto	1/100	IF
TFF3	rabbit	1519	Dr C Tomasetto	1/500	IF
Cdx2	mouse	CDX2-88	BioGenex	1/500	IHC
p53	mouse anti-human	DO-7	Dako	1/200	Ventana
p53	rabbit anti-mouse	CM5	Novocastra	1/100	IF
Mdm2	mouse anti-human	IF2	Invitrogen	1/500	IHC
Bcl-2	mouse	clone 124	Dako	1/100	Ventana
E-cadherin	mouse	clone 36	BD Transduction Laboratories™	1/1000	IF
β -catenin	mouse	clone 14	BD Transduction Laboratories™	1/100	IHC
α -SM1	mouse	Clone 1A4	Dako	1/300	Ventana
MSH2	mouse	G219-1129	Ventana	prediluted	Ventana
MLH1	mouse	G168-728	Ventana	prediluted	Ventana
Ki67	mouse	MM1	Novocastra	1/200	IHC
TLR4	rabbit	CD284	Imgenex	1/50	IHC
CD31	mouse	MEM-05	Invitrogen	1/200	IF
CD45	mouse	2B11+PD7/26	Dako	1/100	Ventana
CD68	mouse	KP1	Dako	1/4000	Ventana

Supplementary Table 1: Specificities, sources and dilutions of antibodies used
(IF: immunofluorescence; IHC: immunohistochemistry)

Gene	Sequences (5' to 3')
<i>Tg-lama1</i>	GCCTCATTCCGGGGCTGTGTG
	AATGTGGTATGGCTGATTATG
<i>Tg-lama5</i>	CTGATCAATGGGGCCCCTGTCAAC
	AATGTGGTATGGCTGATTATG
<i>LAMA1</i>	GACAGCCCGGTGTCTGCCTTCACG
	GTGGCGGTTTTGGGCTCATATGCA
<i>LAMA5</i>	TCCCCTACTGCGAAGCTG
	CCTCAGGAAGGGCAGGAT
<i>LAMA3</i>	TGCCCATGTCCTCACACTAA
	CACGTCTCCCCATTAC
<i>LAMB1</i>	CCACTGAAAAACATTGGGAATC
	TGAGCCATCATTTCTGTAACATC
<i>LAMC1</i>	CACAGAGGCCAAGAACAAGG
	CTTGGTGCTGGTGGCATT
TP53	QuantiTect® primer assay Quiagen

Supplementary Table 2: Sequences of the primers used for genotyping and RT-QPCR

Notes relatives à la publication 2

IV. Notes relatives à la publication 2

Note 1 : Par le biais d'une collaboration avec le Dr. Klauss-Peter Janssen (Technische Universitaet, Muenchen), nous avons obtenu récemment des souris possédant un allèle p53 muté qui peut être exprimé dans l'épithélium intestinal grâce à un système Cre/LoxP (Olive et al., 2004). Ces souris expriment alors la mutation R172H (analogue de la mutation structurale humaine R175H) c'est-à-dire dont l'arginine du codon n°172 est remplacé par une histidine. En plus de faire perdre sa fonction suppresseur de tumeur à la protéine p53, cette mutation change de façon dramatique la conformation de la protéine p53, et est également décrite comme étant une mutation « gain de fonction », ce qui lui donne des propriétés oncogéniques (Xu, 2006). Une expérience préliminaire a été réalisée afin de déterminer si l'inflammation associée à une telle mutation allait promouvoir ou modifier l'apparition de tumeurs. Ainsi à ce jour, 6 couples de souris ont été soumis à un traitement de 4 cycles de DSS (un cycle = une semaine de traitement DSS puis une semaine d'eau normale). Les souris ont été disséquées, et l'analyse des intestins va pouvoir démarrer. Par la suite, il serait intéressant de croiser ces souris Villin-Cre p53LSL-R172H (Lox-Stop-Lox) avec nos souris transgéniques surexprimant la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans le but d'obtenir un modèle plus proche des événements naturels qu'une induction de la tumorigenèse par un inducteur chimique comme l'AOM.

Note 2 : Afin d'appuyer les scores histologiques et de quantifier l'inflammation consécutive au traitement par le DSS des souris transgéniques Tg-*lama5*, les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β et TNF α seront dosées par la technique Elisa par le Dr. Frédéric Barreau (INSERM U763, Hôpital Robert Debré, Paris) dans le cadre d'une collaboration. Les résultats préliminaires de cette étude (obtenus pour l'instant pour une cytokine sur 2 couples d'animaux) tendent à confirmer que l'inflammation est moindre dans nos souris transgéniques.

Note 3 : Cette étude a permis de montrer qu'une surexpression de la protéine p53 wt permettait d'activer l'expression endogène de la chaîne $\alpha 1$ de laminine. Notre hypothèse est que dans le contexte pathologique, la protéine p53 peut être mutée. Nous avons entamé une collaboration avec le Dr. Laurent Bermont (Université de Franche-Comté) qui se propose de séquencer le gène p53 présent dans les cellules de nos glandes « UACL ». Des carottages de ces glandes ont ainsi été réalisés à partir de 2 résections chirurgicales de côlon issu de patients atteints de la maladie de Crohn à partir d'un bloc en paraffine. Le premier séquençage réalisé a révélé une mutation dans le codon 229, codon également muté dans certains cas de cancer du poumon (Lehman et al., 1991). Par ailleurs, le groupe du Dr. Wright a récemment publié une étude sur la recherche de mutations dans des cas de cancers associés aux colites (Leedham et al., 2009). Il en ressort deux mutations représentatives : la mutation structurale R175H (décrite dans la note 1) et la mutation de contact R273H (mutation qui affecte directement la zone de liaison à l'ADN). Ces deux mutations sont des mutations gain de fonction. Il est donc intéressant de voir si l'une d'elles est capable d'activer l'expression endogène de la chaîne $\alpha 1$ de laminine par transfection. A cette fin, nous avons acquis des plasmides porteurs de la protéine p53 avec la mutation R175H ou la mutation R273H. Ces expériences seront réalisées dans des cellules HCT116 invalidées pour le gène p53 (HCT116 p53^{-/-} ; Bunz et al., 1998), et le taux endogène des ARNm du gène *lama1* sera évalué par RT-PCR quantitative.

Note 4 : Une fois établi le fait que la protéine p53 activait l'expression du gène *lama1*, il s'avère intéressant de savoir si cette régulation est directe. L'expérience montrant une activation de l'expression du gène *lama1* après seulement 6h de transfection du plasmide p53 est un premier argument allant dans le sens d'une régulation directe. Afin de conforter cette hypothèse, des études de promoteur du gène *lama1* vont démarrer. Le promoteur *lama1* a été cloné et caractérisé au laboratoire (Piccinni et al., 2004). Le promoteur *lama1* humain de 2kb placé devant un gène rapporteur luciférase, disponible au laboratoire, possède un site de fixation pour la protéine p53 (analyse informatique génomatix). Nous nous proposons de muter ce site par une mutagenèse dirigée (grâce au kit « site directed mutagenesis » de Promega), puis de réaliser des expériences de co-transfection du plasmide *lama1*-luciférase muté avec un plasmide codant pour la protéine p53 et de comparer cette activité à celle du promoteur intact. De plus, il sera intéressant d'analyser à la fois la forme wt de la protéine p53 et les formes mutées).

Note 5 : Afin d'analyser les éventuels effets du transgène Tg-*lama5* sur des mécanismes de réparation plus avancés/tardifs un petit nombre de souris Tg-*lama5* traitées au DSS a été disséqué 5 et 10 jours après la fin du traitement. Cette expérience a révélé que pour les souris disséquées 3 jours après la fin du traitement DSS, on observait des glandes positives pour le marquage nucléaire p53, mais que ces glandes étaient faiblement marquées pour la chaîne $\alpha 1$ de laminine. 5 jours après la fin du traitement au DSS, le marquage nucléaire de p53 semble s'atténuer : il y a moins de glandes marquées, et l'intensité de marquage est également réduite. Parallèlement, les glandes sont de plus en plus fortement marquées pour la chaîne $\alpha 1$ de laminine. Ce phénomène s'accroît encore d'avantage 10 jours après la fin du traitement au DSS. Cette observation permet de supposer que l'accumulation nucléaire de la protéine p53 est le premier événement à survenir en réponse à l'inflammation. Puis la protéine p53 activerait l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine. Cependant le petit nombre de cas étudiés doit être augmenté afin de pouvoir généraliser ces observations.

Par ailleurs, lors des traitements AOM/DSS des souris transgéniques, nous avons pu constater que les souris Tg-*lama5* ne développaient pas de tumeurs à court terme, ce qui laisse supposer que la chaîne $\alpha 5$ ne joue pas de rôle pro-tumoral. Son implication dans les processus de cancérogenèse pourrait plutôt être liée à la progression ou à l'entretien des tumeurs (données du travail de thèse du Dr. Ritié-Pertusa, U682, notre équipe, 2008).

Discussion des résultats de la partie 2

V. Discussion des résultats

Les résultats obtenus lors de ce travail nous permettent d'éclaircir le rôle que peuvent adopter les laminines lors de l'inflammation intestinale. Nous avons de façon intéressante établi, et ceci pour la première fois, un lien entre la protéine suppresseur de tumeur p53 et une ré-expression de laminines dans des glandes particulières trouvées dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ces glandes atypiques ont pu être identifiées comme étant les UACL décrites par les groupes des Drs. Wright et Rio (Wright et al., 1990 ; Rio et al., 1991). Nous avons également décrit pour la première fois la composition en laminines de la lame basale entourant ces glandes : principalement, une forte expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$.

Parmi les questions qui restent posées, il y a celle de la **chronologie** des événements qui se succèdent en réponse à l'inflammation, celle du **rôle** des laminines dans cette réponse et celle du **devenir** de ces glandes, en particulier dans l'éventuelle progression des MICI en cancer colorectal.

V.1. Chronologie des événements en réponse à l'ulcération : accumulation nucléaire de la protéine p53 et expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines

Nous avons clairement pu établir *in vitro* qu'une surexpression de la protéine p53 wt pouvait stimuler l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine, mais ne stimulait par contre pas celle de la chaîne $\alpha 5$ (**Figure 5, publication 2**). Ce résultat est étayé par l'observation des intestins des souris 3 jours après l'arrêt d'un traitement au DSS: dans les zones de régénération apparaissent des glandes dont les noyaux accumulent p53 (**Figure 6, publication 2**). La lame basale entourant la plupart de ces glandes n'est cependant pas délimitée par la chaîne $\alpha 1$ de laminine. Par contre, les premiers résultats de l'étude de ces souris 5 et 10 jours après la fin du traitement au DSS ont montré que lors du processus de réparation plus tardif, le marquage nucléaire de la protéine p53 a tendance à diminuer en intensité puis à disparaître, au profit de l'apparition d'un fort marquage de la chaîne $\alpha 1$ de laminine dans la lame basale entourant les glandes en régénération (non illustré). Par ailleurs, ces glandes présentent de fortes homologies avec les UACL décrites dans les MICI chez l'homme, et l'on peut donc supposer que ce mécanisme y est également présent. A la vue des résultats *in vitro*, la chaîne $\alpha 5$ de laminine, quant à elle, ne serait donc pas directement stimulée par la protéine p53 ; son expression pourrait découler d'une stimulation par la chaîne $\alpha 1$, comme les travaux effectués au laboratoire à partir de greffes de cellules HT29 surexprimant la chaîne $\alpha 1$ de laminine ont déjà pu le suggérer (De Arcangelis et al., 2001).

La question de savoir si à l'inverse les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines pouvaient stimuler l'expression de la protéine p53 a également été posée. Les résultats *in vitro* invalident cette hypothèse (**Figure 5 de la publication 2**). Dans un même ordre d'idée, les études sur les souris Tg-*lama1* ont montré que celles-ci ne développaient pas plus de glandes dont les noyaux accumulent p53 après traitement au DSS que les souris Tg-*lama5* ou les souris contrôles ; ceci est un argument supplémentaire selon lequel le microenvironnement ne stimulerait pas l'expression de p53. De plus, les souris Tg-*lama1* ne présentent aucune accumulation nucléaire de la protéine p53 sans traitement préalable au DSS, prouvant que le facteur

déclencheur est l'inflammation, en réponse de laquelle p53 s'accumule et stimule l'expression de la chaîne $\alpha 1$ de laminine.

V.2. Rôle des laminines dans l'inflammation

Le traitement des souris *Tg-lama1* et *Tg-lama5* au DSS nous a appris que celles-ci étaient moins sensibles à l'ulcération que les souris contrôles. Ce phénomène est probablement dû à un renforcement de la barrière intestinale par une lame basale plus dense ou enrichie. En effet, celle-ci est notamment renforcée au niveau du fond des glandes, et elle est également « épaisse » comme l'atteste un marquage par immunofluorescence. De ce fait, les cellules épithéliales seront moins facilement attaquées par les cytokines inflammatoires, ou par les bactéries ou haptènes responsables de l'inflammation. Un argument supplémentaire à cette hypothèse pourrait être que le phénomène est amplifié dans les souris *Tg-lama5*, qui présentent une lame basale renforcée sur une zone plus étendue que les souris *Tg-lama1*, c'est-à-dire tout le long de l'axe crypto-villositaire.

D'autre part, la surexpression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ observée dans la lame basale entourant les glandes coliques (aussi bien les « normales » que les UACL) pourrait participer à la réparation de ces glandes et à rétablir leur intégrité. Ces chaînes sont fortement impliquées dans le développement embryonnaire, et nous avons pu démontrer au laboratoire leur implication dans des mécanismes de prolifération cellulaire, et de différenciation, mécanismes indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale (De Arcangelis et al., 1996; Simon-Assmann et al., 2010 et Publication 1).

De ce fait, il serait intéressant à des fins thérapeutiques d'imaginer un moyen de stimuler l'expression de ces chaînes spécifiques de laminine chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : ainsi on pourrait espérer diminuer la fréquence d'apparition ou l'intensité des phases d'ulcération. Par analogie, une étude a démontré qu'une injection de laminine-111 dans le muscle permettait de soigner certains types de myopathies (Rooney et al., 2009). On pourrait alors supposer que l'injection de laminine-111 ou -511 dans les zones d'ulcération repérées lors d'une coloscopie pourrait freiner voire réparer l'ulcération.

V.3. Devenir des glandes UACL ? Vers la régénération cellulaire ou la tumorigenèse ?

La question reste posée de connaître le devenir des glandes atypiques trouvées dans les MICI. L'anticorps que nous avons utilisé pour marquer la protéine p53 reconnaît la forme wild type (wt) et des formes mutées de p53. Ainsi nous pouvons postuler deux hypothèses : soit nos glandes vont aller vers la régénération et la réparation cellulaire (avec alors un fonctionnement correct de p53), soit ces glandes vont dégénérer en cancer associé aux colites (avec dans ce cas la présence d'une mutation de p53).

Les différents immunomarquages et investigations que nous avons menés jusqu'à présent ne nous permettent pas d'apporter une réponse claire à cette question. Toutefois, les résultats acquis nous permettent d'envisager quelques pistes de recherche.

V.3.1. Hypothèse du fonctionnement normal de la protéine p53 wt : régénération ?

Dans ce premier cas, l'inflammation provoque un stress cellulaire responsable de l'activation de p53, c'est-à-dire qu'il va être « uprégulé ». La protéine va alors assurer son rôle de contrôleur de « check point » et provoquer l'arrêt du cycle cellulaire. A partir de là, l'intégrité de la cellule va être vérifiée, et les mécanismes de réparation vont être enclenchés le cas échéant, entraînant l'activation de gènes de réparation comme p53BP1 (p53 binding protein 1), H2AX (variant de l'histone H2A), MLH1 (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2) ou MSH2 (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1) (Gorgoulis et al., 2005). Si la réparation s'est effectuée correctement, la cellule va passer un deuxième « check point », et pouvoir se remettre à proliférer. Sinon, la cellule va entrer soit en apoptose, soit en sénescence.

Dans notre étude, nous observons une accumulation nucléaire de p53. Dans l'hypothèse d'une protéine « wt », nous devrions également observer une accumulation nucléaire de la protéine régulatrice Mdm2, qui assure le rétrocontrôle de p53 (Nenutil et al., 2005). En effet, Mdm2 transporte la protéine p53 du noyau vers le cytoplasme où elle sera séquestrée puis détruite, afin qu'elle ne puisse pas en permanence agir sur l'ADN. Les immunomarquages que j'ai réalisés ne révèlent pas de marquage nucléaire de Mdm2 dans les cellules où p53 est accumulé (**Figure 41**). Nous avons démarré la recherche des gènes de réparation tels que MLH1 et MSH2, mais les résultats obtenus jusqu'à présent ne nous permettent pas d'établir de conclusion évidente.

Par ailleurs, le marquage au Ki67 que nous avons effectué indique que les cellules qui composent nos glandes atypiques ne prolifèrent pas (**Figure 41**). Il est cependant envisageable que ces cellules soient dans une phase plus précoce de division, et l'utilisation de marqueurs tels que c-myc ou la cycline D1 pourrait apporter des éléments de réponse. De plus, ces molécules sont des cibles directes de la β -caténine, que nous avons trouvée nucléaire dans certaines cellules des glandes atypiques p53 positives (**Figure 4, publication 2**).

Enfin, la technique TUNEL et l'utilisation d'un kit de recherche de cellules sénescents montrent que les cellules des glandes atypiques ne sont ni en apoptose (**Figure 41**) ni en sénescence (non illustré).

Le marquage particulier des mucines que nous avons observé présente de très fortes similitudes avec celui décrit par Wright et collègues dans leurs UACL (Longman et al., 2000). Ces observations couplées avec l'expression particulière de TFF1 qu'ils ont observée leur a permis d'émettre l'hypothèse que ces glandes UACL seraient des glandes régénératives, à la vue de la fonction de facteur de réparation des facteurs en trèfle (Mathelin et al., 2005).

Afin d'apporter des arguments dans l'hypothèse d'un éventuel rôle régénératif des glandes atypiques, il serait intéressant de rechercher des marqueurs de cellules souches ou progénitrices. L'hypothèse serait que nos glandes atypiques pourraient régénérer à partir d'une cellule possédant les informations nécessaires à redonner le lignage colique épithélial. Parmi les marqueurs classiques de cellules souches intestinales, on peut citer Musashi et Lgr5 (voir introduction p. 20 et Todaro et al., 2010). Nous avons pour l'instant recherché une expression de Musashi (**Figure 41**), mais aucune cellule de nos glandes atypiques n'a été trouvée positive dans les 2 cas analysés à ce jour. L'éventuelle présence de cellules progénitrices pourrait être recherchée par des marqueurs comme Pdx1 (déjà retrouvé exprimé dans des UACL - Kaneko et al., 2008) ou Sox9 (Gracz et al., 2010).

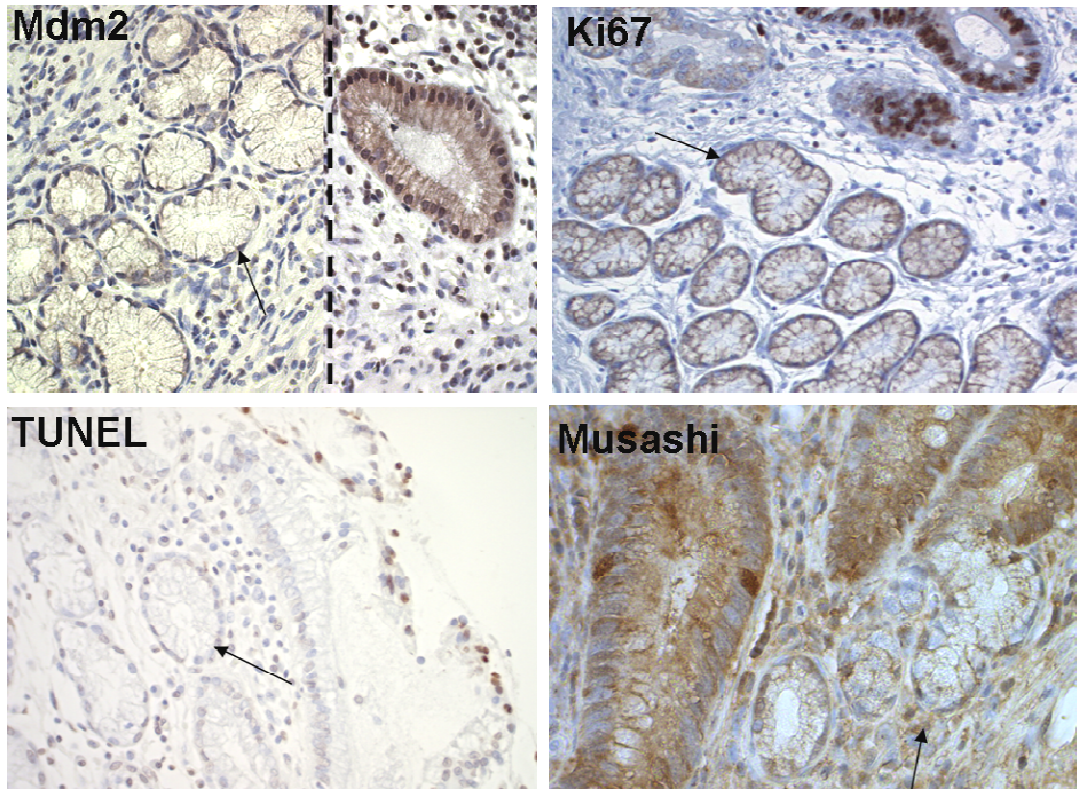


Figure 41 : illustration des différents marqueurs utilisés afin d'identifier le rôle des glandes atypiques (pointées par les flèches). A noter la présence de témoins positifs internes pour chaque marqueur.

V.3.2. Hypothèse d'une mutation de p53 : tumorigène ?

La présence de p53 muté dans des cas de MICI a été détectée dans 2 cas sur 8 dans l'étude réalisée par Leedham et al. (2009). Notre hypothèse d'une mutation de p53 est de prime abord alimentée par les résultats préliminaires du séquençage des glandes atypiques où une mutation de p53 a pu être révélée (voir note 3 p.167). Dans ce cas de figure, l'accumulation nucléaire de p53 observée serait due à la perte de sa fonction suppresseur de tumeur (par contrôle et arrêt du cycle cellulaire). La boucle de rétrocontrôle par Mdm2 ne serait donc pas activée, ce qui expliquerait l'absence de marquage nucléaire de Mdm2 que nous observons. La protéine p53 mutée ne va donc pas provoquer l'apoptose des cellules, ce qui va également dans le sens de nos observations.

Par contre, on pourrait alors s'attendre à une augmentation de la prolifération, ce qui n'est pas notre cas au vu du marquage Ki67. Cependant la recherche de la β -caténine montre une accumulation nucléaire de celle-ci dans certaines cellules de nos glandes atypiques. Un marquage nucléaire de la β -caténine indique une activation de la voie Wnt, qui est activée/dérégulée dans de nombreux cas de cancer (pour revues voir : Giles et al., 2003; Clevers, 2006). De plus un travail sur un modèle d'induction chronique de colites par administration de DSS de façon cyclique à des souris a révélé l'apparition de dysplasies, combinées à une expression nucléaire de la β -caténine et de p53 (Cooper et al., 2000).

Le marquage particulier des mucines que nous avons observé dans nos glandes atypiques est en fait ouvert à une double interprétation. En effet, outre son rôle dans la régénération, une dérégulation des MUC ou des facteurs TFF pourrait également parler en faveur d'un processus de carcinogénèse où il existe des dérégulations de ces molécules (Reis et al., 1999;

Mathelin et al., 2005). A ce titre, une telle dérégulation a été décrite dans des polypes hyperplasiques ou des polypes juvéniles (Mochizuka et al., 2007; Barros et al., 2009). De plus, il a été rapporté que MUC1 pouvait interagir avec la β -caténine de manière compétitive vis-à-vis de la E-cadhérine, ce qui déstabilise les jonctions cellulaires et favorise la dissémination métastatique (Leroy et al., 2006). Un rôle de ces mucines particulières dans un processus de cancérisation de nos glandes atypiques est de ce fait tout à fait envisageable.

Parmi les autres arguments qui conforteraient l'implication possible des glandes atypiques dans la dégénérescence en cancer se trouvent :

- la localisation de la protéine Stat3-phosphorylée dans le noyau de certaines cellules de nos glandes atypiques (marquage réalisé par le Pr. Christophe Borg, CHU de Besançon - Inserm U645), protéine dont le rôle oncogénique a été décrit dans plusieurs travaux (pour revues voir : Danese and Mantovani, 2010; Grivennikov and Karin, 2010).
- la diminution de l'intensité du marquage Smad4, de façon similaire aux polypes (Barros et al., 2009) qui sont la première étape de la cancérogenèse colique (marquage réalisé par M^{elle} Rita Barros, Institut de Pathologie Moléculaire et d'Immunologie de l'Université de Porto).

Enfin, de nombreux arguments parlent en faveur d'un rôle de la chaîne α 1 de laminine comme acteur de la tumorigenèse (introduction p.56 et 57 ; Maatta et al., 2001) et comme activateur de la croissance cellulaire lors des étapes du développement (introduction p.50). A ce titre, il nous paraît nécessaire de réaliser les expériences de transfection du plasmide porteur d'un p53 muté : les résultats obtenus permettront de relier une possible mutation de p53 à l'expression endogène de la chaîne α 1 de laminine. En effet, la plupart des mutations p53 pouvant aboutir à des gains de fonction, on pourrait envisager une stimulation de la chaîne α 1 par la protéine mutée. Ces données, si positives, seraient un argument fort de l'implication de la chaîne α 1 dans la progression tumorale à partir des glandes atypiques.

Afin d'apporter des éléments de réponse, nous envisageons la recherche de marqueurs de cellules souches portés plus particulièrement par les cellules cancéreuses (Todaro et al., 2010) comme CD133 (ou prominine-1, impliqué dans le renouvellement cellulaire et l'angiogenèse des tumeurs), CD166 (ou ALCAM, qui est une molécule d'adhésion cellulaire) ou CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique et molécule d'adhésion cellulaire) qui pourront peut-être nous aider à trancher en faveur de l'une ou l'autre de nos hypothèses.

Conclusion

La difficulté de ce travail est donc de décrypter la séquence des événements qui surviennent chez les patients atteints de MICI et de connaître « l'état » de p53 afin de potentiellement prédire l'évolution de la maladie. Il est possible que dans un premier temps ce soit le mécanisme de réparation impliquant la protéine native p53 qui est observé dans les glandes atypiques, mais qu'au cours des cycles successifs d'ulcération/réparation, des erreurs de réplication (entraînant mutations, perte d'allèles) soient à l'origine d'une mutation de la protéine p53 qui sera alors impliquée dans un mécanisme de tumorigenèse.

En France, le suivi des patients est tel que la chirurgie intervient sans tarder quand la maladie se complique (très fortes ulcérations, sténoses...). La résection chirurgicale de ces zones

ulcérées, qui peuvent potentiellement dégénérer en cancer si l'on favorise l'hypothèse de glandes atypiques pro-tumorales, expliquerait le faible taux de cancer dérivant de MICI que l'on observe.

Partie 3, travail de collaboration :
Étude de la matrice extracellulaire
dans un modèle d'insulinomes murin
surexprimant la ténascine-C

Tenascin-C in matrix channels initiates tumor angiogenesis and promotes metastasis through activation of Wnt signalling by repression of DKK1

Yundan Jia^{+*1}, Falk Saupe^{*1}, Isabelle Gasser^{*1}, Martial Kammerer^{*2}, Marija Marko^{*2}, Caroline Spenle^{*2}, Anja Heinke^{*}, Ruslan Hlushchuk[#], Klaus-Peter Janssen^{''}, Monika Hegi[%], Michael van der Heyden^{*}, Anne-Catherine Feutz⁺, Wentao Huang⁺, Patricia Simon-Assmann^{*}, Agnes Neuville-Mechine^{\$}, Michèle Kedinger^{*}, Valentin Djonov[#], Gerhard Christofori⁺ and Gertraud Orend^{+*&}

1: equal contribution

2: equal contribution

& Corresponding author, Phone: 33 (0)3 88 27 53 55, Fax:33 (0)3 88 26 35 38, E-mail:

gertraud.orend@inserm.u-strasbg.fr

* Inserm, U682, Strasbourg, F-67200 France, University of Strasbourg, CHRU Strasbourg, Department of Molecular Biology, Strasbourg, 67200 France.

+ Institute of Biochemistry and Genetics, Department of Biomedicine, University of Basel, Switzerland

Department of Medicine, Gross Anatomy and Vascular Biology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland

'' Department of Surgery, Technische Universitaet Muenchen, Germany

\$ Faculté de Médecine, University Strasbourg, 67200 Strasbourg, France

% Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), University Lausanne, Switzerland

SUMMARY

The extracellular matrix molecule (ECM) tenascin-C (TNC), whose expression in cancer correlates with a poor prognosis, promotes tumor cell proliferation, angiogenesis, invasion and metastasis. To determine the underlying mechanisms, we established a TNC-driven insulinoma model using SV40 Tag-expressing Rip1Tag2 (RT2) transgenic mice and a orthotopic xenograft model engineered to over-express or lack TNC. TNC over-expressing tumors had enhanced proliferation, angiogenesis, carcinoma progression and lung micrometastasis, which were linked to repression of Dickkopf-1, nuclear localization of β -catenin, and induction of the Wnt targets CD44 and Slug. TNC was expressed in matrix channels that were continuous with blood vessels and provided a conduit for invasion of carcinoma-associated fibroblasts, endothelial cells, and cancer cells.

SIGNIFICANCE

The tumor microenvironment is instrumental in cancer progression. Destruction of tumor endothelial cells rather supports metastasis likely due to tumor hypoxia and the cancerspecific matrix that remains unaffected. TNC, a major component of the cancer specific matrix, potentially contributes to this adverse effect. By mimicking high expression of TNC in cancers of a transgenic mouse model we show that TNC promotes tumor angiogenesis and progression. Our results implicate canonical Wnt signalling as an underlying mechanism, and advance a new model in which tumor cells construct a TNC driven ECM scaffold to enable angiogenesis. Targeting tumor-generated ECM could serve as a new approach for cancer therapy. Our cancer model may also be suitable for testing drugs targeting human TNC.

Multistage Tumorigenesis in RipTag Transgenic Mice

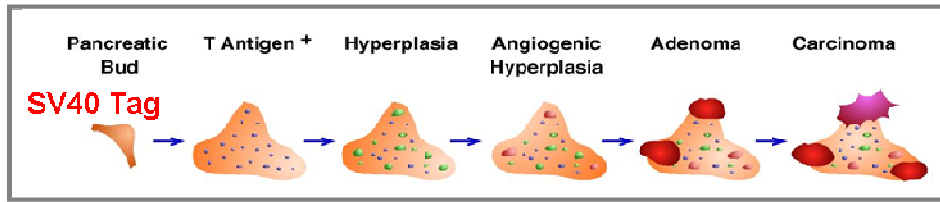


Figure 42 : étapes de la formation de tumeurs des cellules β du pancréas dans les souris transgéniques RipTag. (D'après G. Cristofori)

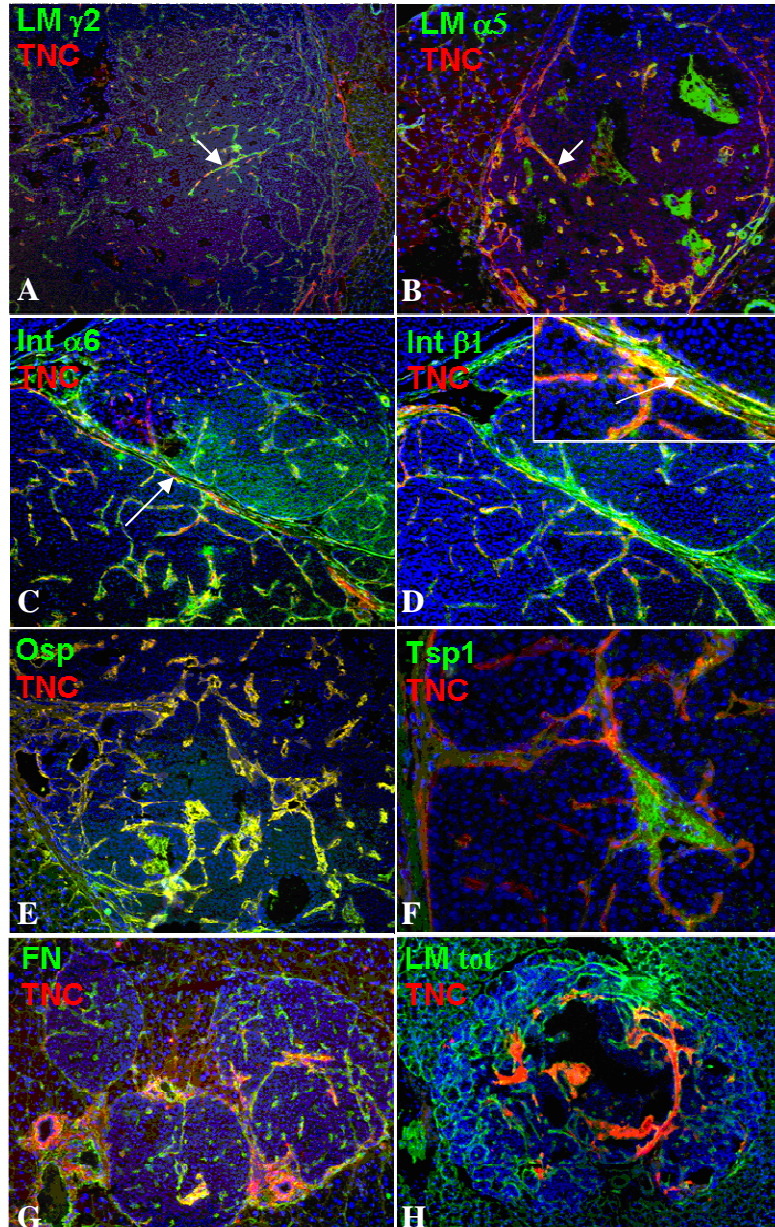


Figure 43: co-immunomarcage de différents éléments de la matrice extracellulaire avec la TNC dans les insulinomes de souris double transgéniques RipTag/hTNC à 14 semaines d'évolution. (A et B) Les chaînes $\gamma 2$ (vert) et $\alpha 5$ (vert) de laminine forment des structures assimilables à des travées (flèches). (C-G) Le marquage d'autres molécules liées à la matrice extracellulaire comme les sous-unités d'intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ (vert), l'ostéopontine (Osp, vert), la thrombospondine1 (Tsp1, vert) ou la fibronectine (FN, vert), se superpose à ces conduits. (H) L'anticorps pan-laminine (LM tot, vert) révèle une structure en forme de travée remplie de TNC (rouge).

Au cours de mon stage doctoral, notre équipe a fusionné avec celle du Dr. G. Orend, venue de Bâle (DR2, INSERM) qui s'intéresse au microenvironnement tumoral, et tout particulièrement à la ténascine-C (TNC). Cette molécule est fortement impliquée dans la progression tumorale, comme mentionné dans l'introduction à la page 57. Dans l'optique de l'étude des mécanismes précis du rôle de la TNC lors de la cancérogenèse, j'ai participé à un travail visant à caractériser la matrice extracellulaire dans un modèle murin d'insulinomes qui surexpriment la TNC.

Les souris RipTag expriment l'antigène T du virus simien SV40 (Tag) sous contrôle du promoteur de l'insuline de rat (Rip) (Hanahan, 1985; Ryschich et al., 2002). Ces souris développent des tumeurs à partir de cellules β du pancréas : on observe une hyperprolifération de ces cellules, et une néovascularisation qui donnera lieu à des tumeurs richement vascularisées (**Figure 42**). Ces tumeurs reproduisent les différentes phases caractéristiques de la tumorigenèse allant jusqu'aux carcinomes. Ces souris représentent un intéressant modèle d'étude des insulinomes humains. Elles ont été croisées avec des souris exprimant le gène humain de la TNC (hTNC) sous contrôle du promoteur Rip produisant ainsi des souris doubles transgéniques : RipTag/RiphTNC. La question était donc de connaître la répercussion de la surexpression de TNC dans la cascade de cancérogenèse et dans la formation d'éventuelles métastases (sujets de thèse de M^{elle} Isabelle Gasser et de M. Falk Saupe, U682 dans notre équipe).

Dans ce travail, mon rôle a été de localiser certaines molécules de la matrice extracellulaire par immunomarquage afin de caractériser le microenvironnement des tumeurs RipTag/RiphTNC. Ainsi dans un premier temps, j'ai étudié l'immunomarquage de la chaîne $\alpha 5$ de laminine, ubiquitaire et fortement exprimée dans le pancréas (Nikolova et al., 2006) et de la chaîne $\gamma 2$, constitutive de la laminine-332 qui joue un rôle dans la progression tumorale (Guess and Quaranta, 2009). Ces chaînes délimitent au sein des tumeurs, aussi bien chez les souris RipTag que les souris RipTag/RiphTNC, des structures allongées qui traversent la tumeur (**Figure 43, A et B**). A noter que l'on observe parfois des lacunes dans ces tumeurs, qui sont à l'occasion comblées par de la laminine $\alpha 5$ (**Figure 43, B**).

Dans un deuxième temps, j'ai cherché à savoir si les récepteurs des laminines représentés par les sous-unités d'intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ sont également présentes dans les tumeurs des souris RipTag/RiphTNC. L'immunomarquage révèle en effet que ces molécules semblent border les travées de laminine que nous avons précédemment observées (**Figure 43, C et D**).

Par ailleurs, j'ai également recherché d'autres molécules de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et différents types de collagènes (de type IV, V et pro-collagène III). Toutes ces molécules semblent également faire partie intégrante des travées de matrices (**Figure 43, G** et non illustré).

L'ostéopontine est une molécule structurale faisant le lien entre les cellules et la matrice extracellulaire, qui peut jouer un rôle à la fois pro-inflammatoire et pro-tumoral (Chabas, 2005). La thrombospondine1 est quant à elle une glycoprotéine extracellulaire responsable de l'adhésion cellulaire, et elle est souvent trouvée dérégulée dans les tumeurs, en participant au remodelage de la matrice extracellulaire (Tan and Lawler, 2009). Il était donc intéressant de voir si nous pouvions localiser ces deux molécules dans le microenvironnement des tumeurs des souris RipTag et RipTag/hRiphTNC. La détection de ces protéines à l'aide d'anticorps spécifiques a permis de les assimiler également aux travées de matrice que nous pouvons observer (**Figure 43, E et F**).

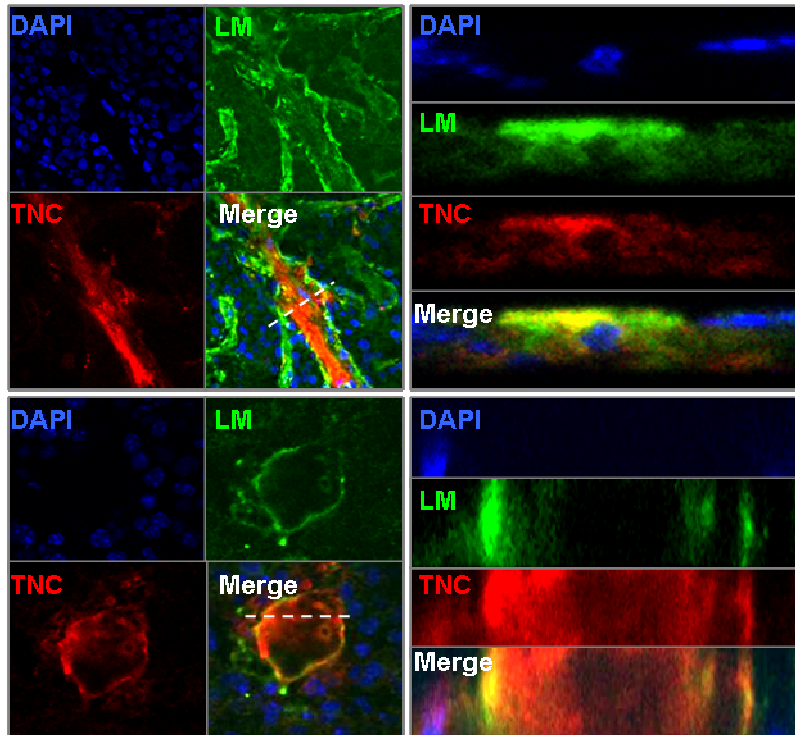


Figure 44 : co-immunomarquage par des anticorps anti-pan-laminines (LM, vert) et anti-TNC (rouge) observé au microscope confocal. Des coupes en « z » ont été réalisées au niveau des zones définies par des tirets à travers un conduit : coupe sagittale (panneaux du haut) et coupe transversale (panneaux du bas). A noter la présence de noyaux dans ces conduits (visualisés en bleu, DAPI).

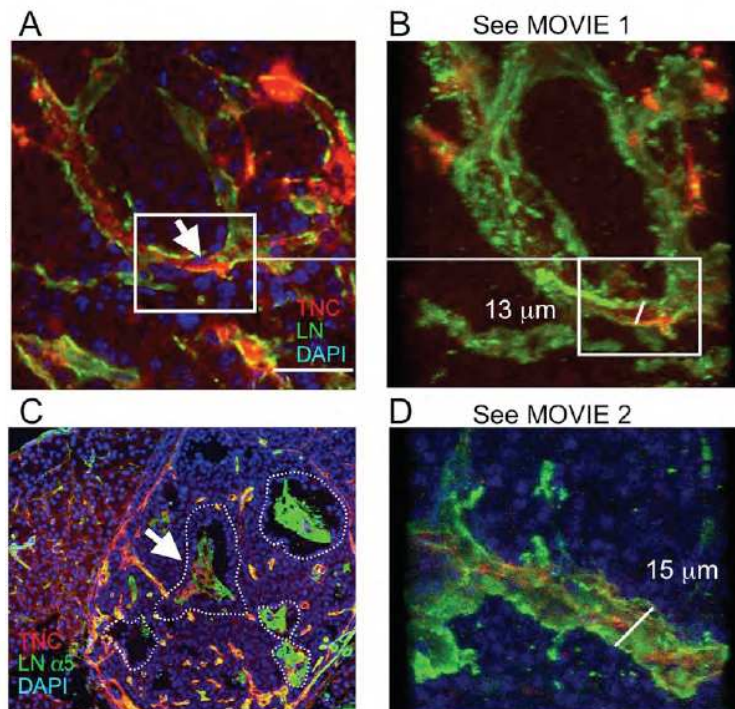


Figure 45 : tirée de Jia et al. en préparation. Reconstitution 3D de conduits marqués par des anti-corps anti-laminine (LN, vert) et anti-TNC (rouge) à la fois dans les souris simple transgénique (**A** et **B**) et dans les doubles transgéniques (**C** et **D**). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (bleu).

J'ai ensuite co-marqué ces tumeurs avec un anticorps reconnaissant la TNC et un anticorps pan-laminine reconnaissant plusieurs isoformes de laminine (LMtot **Figure 43, H**). Ces expériences m'ont permis de montrer que certaines des « travées » de laminines étaient remplies de TNC : le marquage identifiant la TNC est en général juxtaposé à celui des laminines (**Figure 43, H**). Il s'agissait là d'une observation par microscopie à fluorescence. Afin d'approfondir cette hypothèse selon laquelle les laminines formeraient des conduits remplis de TNC j'ai pu réaliser sur des coupes épaisses une reconstitution en 3 dimensions par microscopie confocale (collaboration avec M. Mutterer, IBMP qui s'est chargé des acquisitions). Cette méthode m'a permis de révéler par des coupes en « z » que les marquages obtenus avec les anticorps anti-laminines et anti-TNC étaient bien juxtaposés, et non superposés (**Figure 44**). Ces coupes ont également permis de révéler l'existence de noyaux au sein des travées de laminines. Par ailleurs, la reconstitution en 3 dimensions a permis de révéler que les travées étaient en fait des conduits dans l'espace (**Figure 45** et cd-rom joint).

Cette hypothèse selon laquelle des conduits de matrice extracellulaire pourraient se former au sein de structures particulières avait déjà soulevée dans des travaux sur le transport de petites molécules dans le thymus (Drumea-Mirancea et al., 2006) et dans des travaux sur les mécanismes d'invasion dans les mélanomes (Kaariainen et al., 2006). Il est donc intéressant de penser que les conduits composés de molécules de la matrice extracellulaire observés dans les tumeurs des souris RipTag/RiphTNC pourraient servir à transporter des cellules hors de la tumeur, et donc promouvoir le processus de diffusion de métastases. Les cellules qui sont à l'intérieur des conduits restent cependant à être identifiées. Par ailleurs, certains conduits de matrice semblent aboutir à des vaisseaux sanguins à la périphérie de la tumeur (voir **Figure 43, C** et **D**). Des marquages avec un anti-corps anti-CD31 (marqueur des cellules endothéliales des vaisseaux) effectués au laboratoire par Isabelle Gasser confirment cette observation.

Ces données permettent ainsi d'émettre l'hypothèse d'un modèle de conduits composés de molécules de la matrice extracellulaire probablement sécrétées par des fibroblastes associés au cancer (CAF) ; ces conduits entourés de laminines et remplis de TNC se jetteraient dans les vaisseaux sanguins et permettraient le transport de cellules, dont on peut penser qu'il pourrait s'agir de cellules métastatiques (**Figure 46**).

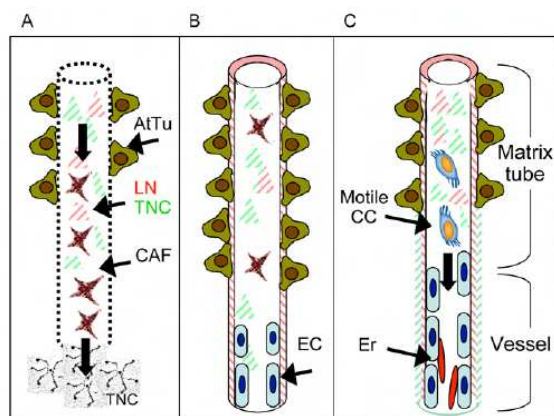


Figure 46 : schéma proposant le rôle de la TNC lors de la progression tumorale. (A) la TNC est induite lors de la tumorigénèse par des stimuli comme l'hypoxie, le stress mécanique ou des facteurs solubles. Elle recrute alors des fibroblastes associés au cancer (CAF) qui vont sécréter des molécules de la matrice extracellulaire. (B) Les conduits de matrices vont atteindre des vaisseaux sanguins. (C) Ces conduits permettent de transporter des cellules cancéreuses (Motile CC) hors de la tumeur primaire. (Tiré de Jia et al.) EC : cellule endothéliale, ER : érythrocyte

Discussion générale

L'objectif de mon travail de thèse a été de rechercher le rôle des laminines, éléments clés de la matrice extracellulaire, et en particulier celui de la chaîne $\alpha 5$, dans le fonctionnement intestinal normal et pathologique. Dans l'intestin en développement et adulte, les gènes cibles de la laminine-511 et plus particulièrement de la chaîne $\alpha 5$, ainsi que les voies de signalisation qui lui sont associées, ont pu être déterminés grâce à des modèles d'inactivation totale ou conditionnelle, aussi bien chez la souris que dans des cultures cellulaires.

J'ai pu établir que la laminine-511 inhibait la voie de signalisation Wnt. La voie Wnt est classiquement connue pour mener à une stimulation de la prolifération cellulaire tant au cours du développement que lors de la tumorigenèse (Clevers 2006). Ainsi l'inhibition observée de cette voie, combinée aux données morphologiques des intestins adultes invalidés au niveau de l'épithélium pour la chaîne $\alpha 5$ suggèrent que celle-ci joue un rôle dans la différenciation épithéliale, aussi bien lors du développement que dans l'homéostasie de l'intestin adulte. Cette hypothèse est appuyée par la présence de nombreux gènes impliqués dans des processus de différenciation trouvés dérégulés dans l'analyse transcriptomique (publication 1). L'étude du rôle de la chaîne $\alpha 5$ chez l'adulte mérite d'être poursuivie par la caractérisation des lignées intestinales invalidées obtenues par immortalisation. Ces cellules permettront d'une part de réaliser des études mécanistiques et d'autre part de connaître le devenir de cellules invalidées pour la chaîne $\alpha 5$, tant au point de vue de la prolifération que de la différenciation cellulaire. Ces cellules seront des outils précieux quant à l'étude plus approfondie et plus directe des voies de signalisation Wnt et PI3K/Akt.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les observations effectuées sur les prélèvements intestinaux pathologiques, en particulier les MICI, où les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines sont surexprimées dans le fond de glandes coliques (publication 2). Les modèles animaux d'inflammation combinés à la surexpression de ces chaînes de laminines m'ont permis de démontrer que ces molécules joueraient un rôle protecteur contre l'inflammation. Toutefois, le mécanisme responsable de cette protection reste encore à être déterminé. Les voies de signalisation impliquant le NF- κ B sont principales dans l'inflammation. Une étude effectuée par Armstrong et al. (2008) a montré que la laminine-111 est capable d'activer une voie impliquant le NF- κ B dans les cellules de Schwann menant à la stimulation de la pousse des neurites. Le NF- κ B pouvant jouer un rôle à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (pour revue, voir Wullaert 2010), il est intéressant de rechercher le mécanisme d'action de chaînes spécifiques de laminine sur cette voie, selon le contexte physiologique. Les expériences préliminaires menées grâce aux cellules rapportrices NK- κ B-luciférase tendent à montrer que la chaîne $\alpha 5$ de laminine inhiberait plutôt la réponse inflammatoire au TNF α médiée par le NF- κ B (figure 5B, publication 2). Ces expériences devront toutefois être reproduites afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Certaines données obtenues grâce à l'analyse transcriptomique des intestins invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ de laminine pourront nous permettre de comprendre certains phénomènes observés dans l'intestin pathologique. A titre d'exemple, il a été décrit dans la maladie de Crohn une augmentation du facteur de transcription Klf4 (Gersemann et al., 2009), facteur intervenant dans la différenciation des cellules à mucus. Or l'analyse transcriptomique des intestins murins invalidés pour la chaîne $\alpha 5$ a révélé une surexpression de Klf4, corrélée à une dérégulation du nombre de cellules à mucus dans les intestins mutants (publication 1). Chez les patients atteints de maladie de Crohn, les premiers stades d'ulcération entraînent la destruction de la lame basale et ainsi une perte de la chaîne $\alpha 5$ de laminine. On pourrait donc envisager qu'en réponse à cette perte, les voies de signalisation permettant de stimuler la

production de cellules à mucus nécessaires à la protection de l'épithélium intestinal soient activées.

Par ailleurs, les MICI étant caractérisées par des phases d'ulcération entrecoupées de phase de rémission, il sera important de comprendre le rôle des laminines dans les processus de réparation, au vu de leur importance dans l'homéostasie intestinale. De nombreux articles récents ont pu mettre en valeur le rôle d'une voie de signalisation encore mal connue, découverte chez la drosophile, la voie Hippo (pour revue, voir Bardet 2009). Il s'agit d'une cascade de phosphorylation qui réprime la transcription de gènes favorisant la prolifération et la survie, et qui intervient afin de stopper la croissance des organes lors du développement. Un lien entre la protéine suppresseur de tumeur p53 et la voie Hippo a pu être mis en évidence : p53 induirait Hippo par un mécanisme encore inconnu afin d'augmenter la mort cellulaire (Colombani et al., 2006). Chez la drosophile, la voie Hippo régule la prolifération des cellules souches intestinales : une perte du signal stimule la prolifération en augmentant d'une part la production de ligands de la voie EGFR et d'autre par les cytokines Unpaired (Upd) activant la voie JAK-STAT. Lors de dommages de l'épithélium, Yorkie (médiateur de la voie Hippo) est requis dans les cellules progénitrices pour répondre aux dommages causés par le DSS chez la drosophile (Ren et al., 2010). De plus, une expression focale de ce facteur YAP (Yes-associated protein), homologue de Yorkie chez les mammifères, a de manière intéressante été trouvée dans des cellules progénitrices et les compartiments en réparation dans du tissu normal (Steinhardt et al., 2008). La chaîne $\alpha 5$ de laminine jouant un rôle protecteur contre l'inflammation, et promouvant la survie des cellules via le facteur Akt, on pourrait également envisager l'existence d'un lien entre la chaîne $\alpha 5$ et le facteur YAP.

L'existence dans les MICI de glandes atypiques qui accumulent p53 dans leur noyau et surexpriment $\alpha 1$ et $\alpha 5$ pose la question du devenir de celles-ci lors de la progression de la maladie. Une surexpression de p53 et des dérégulation de la matrice ont également pu être décrites dans d'autres maladies inflammatoires comme par exemple lors d'inflammation du poumon (González et al., 2008 ; Morissette et al., 2008) mais sans relier ces deux événements. Sachant qu'il existe un lien important entre les phénomènes d'inflammation et la dégénérescence en cancer, il est nécessaire de déterminer le rôle que vont jouer ces deux protagonistes dans l'évolution de la maladie. Deux hypothèses sont envisagées : soit ces glandes sont des glandes régénératives qui participent à la restauration de l'intégrité tissulaire, soit ces glandes participent à la dégénérescence des MICI en cancer colorectal, ces deux hypothèses ne s'excluant pas l'une l'autre.

Claessen et al. (2010) ont pu démontrer récemment que, contrairement à ce qui avait été décrit dans des études précédentes (pour revue, voir Terzic et al., 2010), la voie Wnt pouvait être activée dans les phases précoces des cancers associés aux colites. De plus, il est maintenant admis que le signal PI3K/Akt peut coopérer avec la voie Wnt pour augmenter la β -caténine nucléaire durant l'inflammation (Lee et al., 2010). Ces résultats peuvent être reliés à nos connaissances sur le lien entre la chaîne $\alpha 5$ de laminine et les voies Wnt et PI3K/Akt (publication 1). Il faudra ainsi envisager que la chaîne $\alpha 5$ puisse jouer un rôle différent sur la régulation de la voie Wnt, peut-être de façon spécifique au contexte normal (développement ou maintien de l'homéostasie) et au contexte pathologique (réponse inflammatoire ou dégénérescence en cancer). L'existence de β -caténine nucléaire dans les glandes atypiques de patients atteints de MICI (figure 4, publication 2) ne nous permet pas de conclure quant à sa fonction. En effet, de nombreux gènes cibles de la β -caténine ont été dénombrés, parmi lesquels des gènes de prolifération, de transformation mais aussi de différenciation voire de réparation (pour revue, voir Chien et al., 2009). Par ailleurs, une régulation épigénétique de la

voie Wnt par méthylation des gènes qui appartiennent à cette voie a également été décrite, et participerait à la dégénérescence des MICI en cancer (Dhir et al., 2008).

Les données encore parcellaires de la littérature méritent donc d'être analysées avec prudence afin de potentiellement les relier avec celles que nous avons obtenues à la fois dans l'intestin en développement, adulte et pathologique, et de comprendre au mieux les mécanismes qui permettent soit de restaurer l'homéostasie intestinale, soit d'entraîner la dégénérescence en cancer, afin de mettre en évidence des cibles thérapeutiques.

Références bibliographiques

-A-

Allamand,V., Sunada,Y., Salih,M.A., Straub,V. et al., (1997). Mild congenital muscular dystrophy in two patients with an internally deleted laminin alpha2-chain. *Hum. Mol. Genet.* 6, 747-752.

Alpy,F., Jivkov,I., Sorokin,L., Klein,A., Arnold,C., Huss,Y., Kedinger,M., Simon-Assmann,P., and Lefebvre,O. (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis.* 43, 59-70.

Alpy,F., Ritie,L., Jaubert,F., Becmeur,F. et al., (2005). The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation. *Hum. Pathol.* 36, 1055-1065.

Amin,K., Ludviksdottir,D., Janson,C., Nettelblatt,O., Bjornsson,E., Roomans,G.M., Boman,G., Seveus,L., and Venge,P. (2000). Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir. Crit Care Med.* 162, 2295-2301.

Arikawa-Hirasawa,E., Watanabe,H., Takami,H., Hassell,J.R., and Yamada,Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 23, 354-358.

Armstrong,S.J., Wiberg,M., Terenghi,G., and Kingham,P.J. (2008). Laminin activates NF-kappaB in Schwann cells to enhance neurite outgrowth. *Neurosci. Lett.* 439, 42-46.

Askling,J., Dickman,P.W., Karlen,P., Brostrom,O., Lapidus,A., Lofberg,R., and Ekblom,A. (2001). Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 120, 1356-1362.

Atuma,C., Strugala,V., Allen,A., and Holm,L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 280, G922-G929.

Auclair,B.A., Benoit,Y.D., Rivard,N., Mishina,Y., and Perreault,N. (2007). Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* 133, 887-896.

Aumailley,M., El Khal,A., Knoss,N., and Tunggal,L. (2003). Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol.* 22, 49-54.

Aumailley,M., Bruckner-Tuderman,L., Carter,W.G., Deutzmann,R. et al., (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24, 326-332.

-B-

Babyatsky,M.W., Rossiter,G., and Podolsky,D.K. (1996). Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110, 975-984.

Bader,B.L., Smyth,N., Nedbal,S., Miosge,N., Baranowsky,A., Mokkaapati,S., Murshed,M., and Nischt,R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol. Cell Biol.* 25, 6846-6856.

Barczyk,M., Carracedo,S., and Gullberg,D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269-280.

Bardet,P.L. (2009). [Developmental control of organ growth by the Hippo pathway]. *Med. Sci. (Paris)* 25, 253-257.

Barker,N., van Es,J.H., Kuipers,J., Kujala,P. et al., (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003-1007.

Barker,N., van de Wetering M., and Clevers,H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856-1864.

Barrett,J.C., Lee,J.C., Lees,C.W., Prescott,N.J. et al., (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat. Genet.* 41, 1330-1334.

Barros,R., Mendes,N., Howe,J.R., Reis,C.A., de Bolos,C., Carneiro,F., David,L., and Almeida,R. (2009). Juvenile polyps have gastric differentiation with MUC5AC expression and downregulation of CDX2 and SMAD4. *Histochem. Cell Biol.* 131, 765-772.

Beaugerie,L. (2005). [What is inflammatory bowel disease?]. *Rev. Prat.* 55, 943-948.

Beiter,K., Hiendlmeyer,E., Brabletz,T., Hlubek,F., Haynl,A., Knoll,C., Kirchner,T., and Jung,A. (2005). beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene* 24, 8200-8204.

Bhowmick,N.A., Chytil,A., Plieth,D., Gorska,A.E., Dumont,N., Shappell,S., Washington,M.K., Neilson,E.G., and Moses,H.L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848-851.

Binder,V. and Orholm,M. (1996). Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth. J Med.* 48, 53-56.

Boirivant,M., Fuss,I.J., Chu,A., and Strober,W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp. Med.* 188, 1929-1939.

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.

Bouatrouss,Y., Herring-Gillam,F.E., Gosselin,J., Poisson,J., and Beaulieu,J.F. (2000). Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol.* 156, 45-50.

Brellier,F., Tucker,R.P., and Chiquet-Ehrismann,R. (2009). Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics. *Scand. J Med. Sci. Sports* 19, 511-519.

Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.

-C-

Cadiot, G., Galmiche, J-P., Matuchansky, C. et Mignon M. (2005). Gastroentérologie. Editions Ellipses.

Chabas,D. (2005). [Osteopontin, a multi-faceted molecule]. *Med. Sci. (Paris)* 21, 832-838.

Chawengsaksophak,K., James,R., Hammond,V.E., Kontgen,F., and Beck,F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386, 84-87.

Chien,A.J., Conrad,W.H., and Moon,R.T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol.* 129, 1614-1627.

Chiquet-Ehrismann,R., Tannheimer,M., Koch,M., Brunner,A., Spring,J., Martin,D., Baumgartner,S., and Chiquet,M. (1994). Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol.* 127, 2093-2101.

Chiquet-Ehrismann,R. and Chiquet,M. (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 200, 488-499.

Chiquet-Ehrismann,R. (2004). Tenascins. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 36, 986-990.

Cho,J.H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 458-466.

Cifuentes-Diaz,C., Faille,L., Goudou,D., Schachner,M., Rieger,F., and Angaut-Petit,D. (2002). Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *J Neurosci. Res.* 67, 93-99.

Claessen,M.M., Schipper,M.E., Oldenburg,B., Siersema,P.D., Offerhaus,G.J., and Vleggaar,F.P. (2010). WNT-pathway activation in IBD-associated colorectal carcinogenesis: potential biomarkers for colonic surveillance. *Cell Oncol.* 32, 303-310.

Clevers,H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

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.

Colombani,J., Polesello,C., Josue,F., and Tapon,N. (2006). Dmp53 activates the Hippo pathway to promote cell death in response to DNA damage. *Curr. Biol.* 16, 1453-1458.

Cooper,H.S., Murthy,S., Kido,K., Yoshitake,H., and Flanigan,A. (2000). Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 21, 757-768.

Costell,M., Gustafsson,E., Aszodi,A., Morgelin,M., Bloch,W., Hunziker,E., Addicks,K., Timpl,R., and Fassler,R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol.* 147, 1109-1122.

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-

Danese,S. and Mantovani,A. (2010). Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 29, 3313-3323.

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.

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.

Degen,M., Brellier,F., Kain,R., Ruiz,C., Terracciano,L., Orend,G., and Chiquet-Ehrismann,R. (2007). Tenascin-W is a novel marker for activated tumor stroma in low-grade human breast cancer and influences cell behavior. *Cancer Res.* 67, 9169-9179.

Degen,M., Brellier,F., Schenk,S., Driscoll,R. et al., (2008). Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *Int. J Cancer* 122, 2454-2461.

Degen,M., Goulet,S., Ferralli,J., Roth,M., Tamm,M., and Chiquet-Ehrismann,R. (2009). Opposite effect of fluticasone and salmeterol on fibronectin and tenascin-C expression in primary human lung fibroblasts. *Clin Exp. Allergy* 39, 688-699.

Dhir,M., Montgomery,E.A., Glockner,S.C., Schuebel,K.E., Hooker,C.M., Herman,J.G., Baylin,S.B., Gearhart,S.L., and Ahuja,N. (2008). Epigenetic regulation of WNT signaling pathway genes in inflammatory bowel disease (IBD) associated neoplasia. *J Gastrointest. Surg.* 12, 1745-1753.

Drumea-Mirancea,M., Wessels,J.T., Muller,C.A., Essl,M. et al., (2006). Characterization of a conduit system containing laminin-5 in the human thymus: a potential transport system for small molecules. *J Cell Sci.* 119, 1396-1405.

Dueck,M., Riedl,S., Hinz,U., Tandara,A., Moller,P., Herfarth,C., and Faissner,A. (1999). Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. *Int. J Cancer* 82, 477-483.

Durbeej,M., Henry,M.D., Ferletta,M., Campbell,K.P., and Ekblom,P. (1998). Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem. Cytochem.* 46, 449-457.

Durbeej,M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* 339, 259-268.

Durkin,M.E., Loechel,F., Mattei,M.G., Gilpin,B.J., Albrechtsen,R., and Wewer,U.M. (1997). Tissue-specific expression of the human laminin alpha5-chain, and mapping of the gene to human chromosome 20q13.2-13.3 and to distal mouse chromosome 2 near the locus for the ragged (Ra) mutation. *FEBS Lett.* 411, 296-300.

-E-

Edwards,M.M., Mammadova-Bach,E., Alpy,F., Klein,A. et al., (2010). Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol. Chem.* 285, 7697-7711.

Ekblom,P., Lonai,P., and Talts,J.F. (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol.* 22, 35-47.

El Marjou,F., Janssen,K.P., Chang,B.H., Li,M. et al., (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis.* 39, 186-193.

Engbring,J.A. and Kleinman,H.K. (2003). The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol.* 200, 465-470.

Eyler,C.E. and Telen,M.J. (2006). The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. *Transfusion* 46, 668-677.

-F-

Faler,B.J., Macsata,R.A., Plummer,D., Mishra,L., and Sidawy,A.N. (2006). Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect. Vasc. Surg. Endovasc. Ther.* 18, 55-62.

Feagins,L.A., Souza,R.F., and Spechler,S.J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.* 6, 297-305.

Forsberg,E., Hirsch,E., Frohlich,L., Meyer,M., Ekblom,P., Aszodi,A., Werner,S., and Fassler,R. (1996). Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6594-6599.

Fre,S., Huyghe,M., Mourikis,P., Robine,S., Louvard,D., and Artavanis-Tsakonas,S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964-968.

Fukata,M., Michelsen,K.S., Eri,R., Thomas,L.S. et al., (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288, G1055-G1065.

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-

Gao,J., DeRouen,M.C., Chen,C.H., Nguyen,M. et al., (2008). Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis. *Genes Dev.* 22, 2111-2124.

Gao,N., White,P., and Kaestner,K.H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev. Cell* 16, 588-599.

Gao,N. and Kaestner,K.H. (2010). Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity. *Genes Dev.* 24, 1295-1305.

Garrett,W.S., Gordon,J.I., and Glimcher,L.H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140, 859-870.

Georges-Labouesse,E., Messaddeq,N., Yehia,G., Cadalbert,L., Dierich,A., and Le Meur,M. (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat. Genet.* *13*, 370-373.

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.

Gersemann,M., Becker,S., Kubler,I., Koslowski,M. et al., (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* *77*, 84-94.

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.

Gonzalez,A., Lenzi,H.L., Motta,E.M., Caputo,L., Restrepo,A., and Cano,L.E. (2008). Expression and arrangement of extracellular matrix proteins in the lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Int. J Exp. Pathol.* *89*, 106-116.

Gorgoulis,V.G., Vassiliou,L.V., Karakaidos,P., Zacharatos,P. et al., (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907-913.

Gracz,A.D., Ramalingam,S., and Magness,S.T. (2010). Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *298*, G590-G600.

Grainger,S., Savory,J.G., and Lohnes,D. (2010). Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. *Dev. Biol.* *339*, 155-165.

Grapin-Botton,A. and Melton,D.A. (2000). Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet.* *16*, 124-130.

Grivennikov,S.I. and Karin,M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 11-19.

Guess,C.M. and Quaranta,V. (2009). Defining the role of laminin-332 in carcinoma. *Matrix Biol.* *28*, 445-455.

-H-

Hanahan,D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* *315*, 115-122.

Hayden,M.S. and Ghosh,S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* *132*, 344-362.

He,X.C., Zhang,J., Tong,W.G., Tawfik,O. et al., (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117-1121.

He,X.C., Yin,T., Grindley,J.C., Tian,Q. et al., (2007). PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat. Genet.* 39, 189-198.

Heikius,B., Niemela,O., Niemela,S., Karttunen,T.J., and Lehtola,J. (2002). Elevated serum PIIINP and laminin in inflammatory bowel disease indicate hepatobiliary and pancreatic dysfunction. *Hepatogastroenterology* 49, 404-411.

Hocevar,B.A. and Howe,P.H. (2000). Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components. *Methods Mol. Biol.* 142, 55-65.

Hsia,H.C. and Schwarzbauer,J.E. (2005). Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol. Chem.* 280, 26641-26644.

Hugot,J.P., Chamaillard,M., Zouali,H., Lesage,S. et al., (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.

-I-

Ishikura,T., Kanai,T., Uraushihara,K., Iiyama,R. et al., (2003). Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 18, 960-969.

Itzkowitz,S.H. and Harpaz,N. (2004). Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126, 1634-1648.

-J-

Jivkov I. (2008). La chaîne de laminine $\alpha 1$ dans la différenciation cellulaire et son rôle activateur dans la tumorigénèse intestinale. Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I.

Jones,P.L. and Jones,F.S. (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol.* 19, 581-596.

Jones,R.G., Li,X., Gray,P.D., Kuang,J., Clayton,F., Samowitz,W.S., Madison,B.B., Gumucio,D.L., and Kuwada,S.K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol.* 175, 505-514.

Jurjus,A.R., Khoury,N.N., and Reimund,J.M. (2004). Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol. Toxicol. Methods* 50, 81-92.

-K-

Kaariainen,E., Nummela,P., Soikkeli,J., Yin,M. et al., (2006). Switch to an invasive growth phase in melanoma is associated with tenascin-C, fibronectin, and procollagen-I forming specific channel structures for invasion. *J Pathol.* 210, 181-191.

Kaneko,Y., Nakamura,T., Hayama,M., Hosaka,N., Akamatsu,T., and Ota,H. (2008). Altered expression of CDX-2, PDX-1 and mucin core proteins in "Ulcer-associated cell lineage (UACL)" in Crohn's disease. *J Mol. Histol.* 39, 161-168.

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

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.

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.

Koutroubakis,I.E., Petinaki,E., Dimoulios,P., Vardas,E., Roussomoustakaki,M., Maniatis,A.N., and Kouroumalis,E.A. (2003). Serum laminin and collagen IV in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 56, 817-820.

Kuhn,R., Lohler,J., Rennick,D., Rajewsky,K., and Muller,W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Kuhn,R., Lohler,J., Rennick,D., Rajewsky,K., and Muller,W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Kulkarni,A.B., Huh,C.G., Becker,D., Geiser,A. et al., (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 770-774.

-L-

Langman, J. et Sadler, T.-W. (2000). *Embryologie médicale*. 6^{ème} édition. Editions Pradel.

Lakatos,P.L. and Lakatos,L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol* 14, 3937-3947.

Lee,G., Goretsky,T., Managlia,E., Dirisina,R. et al., (2010). Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* 139, 869-81, 881.

Leedham,S.J., Graham,T.A., Oukrif,D., McDonald,S.A. et al., (2009). Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 136, 542-550.

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.

Lehman,T.A., Bennett,W.P., Metcalf,R.A., Welsh,J.A. et al., (1991). p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 51, 4090-4096.

Lemann,M. and Allez,M. (2005). [Treatment strategies for inflammatory bowel disease]. *Rev. Prat.* 55, 984-992.

Leroy,X., Buisine,M.P., Leteurtre,E., Aubert,S., Buob,D., Porchet,N., and Copin,M.C. (2006). [MUC1 (EMA): A key molecule of carcinogenesis?]. *Ann. Pathol.* 26, 257-266.

Li,J., Tzu,J., Chen,Y., Zhang,Y.P. et al., (2003). Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J* 22, 2400-2410.

Li,L. and Clevers,H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542-545.

Liu,Y., Chattopadhyay,N., Qin,S., Szekeres,C. et al., (2009). Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Development* 136, 843-853.

Longman,R.J., Douthwaite,J., Sylvester,P.A., Poulsom,R., Corfield,A.P., Thomas,M.G., and Wright,N.A. (2000). Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 47, 792-800.

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.

-M-

Maatta,M., Virtanen,I., Burgeson,R., and Autio-Harminen,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.

Macfarlane,G.T., Blackett,K.L., Nakayama,T., Steed,H., and Macfarlane,S. (2009). The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des* 15, 1528-1536.

- Madison,B.B., Braunstein,K., Kuizon,E., Portman,K., Qiao,X.T., and Gumucio,D.L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* *132*, 279-289.
- Mahoney,Z.X., Stappenbeck,T.S., and Miner,J.H. (2008). Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J Cell Sci.* *121*, 2493-2502.
- Martina,E., Chiquet-Ehrismann,R., and Brellier,F. (2010). Tenascin-W: an extracellular matrix protein associated with osteogenesis and cancer. *Int. J Biochem. Cell Biol.* *42*, 1412-1415.
- Mathelin,C., Tomasetto,C., and Rio,M.C. (2005). [Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions]. *Bull. Cancer* *92*, 773-781.
- Matricon,J. (2010). [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease]. *Med. Sci. (Paris)* *26*, 405-410.
- Matsumoto,S., Okabe,Y., Setoyama,H., Takayama,K., Ohtsuka,J., Funahashi,H., Imaoka,A., Okada,Y., and Umesaki,Y. (1998). Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* *43*, 71-78.
- McGuckin,M.A., Eri,R., Simms,L.A., Florin,T.H., and Radford-Smith,G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* *15*, 100-113.
- McLin,V.A., Henning,S.J., and Jamrich,M. (2009). The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* *136*, 2074-2091.
- Meng,X., Klement,J.F., Leperi,D.A., Birk,D.E., Sasaki,T., Timpl,R., Uitto,J., and Pulkkinen,L. (2003). Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* *121*, 720-731.
- Mettouchi,A., Cabon,F., Montreau,N., Dejong,V., Vernier,P., Gherzi,R., Mercier,G., and Binetruy,B. (1997). The c-Jun-induced transformation process involves complex regulation of tenascin-C expression. *Mol. Cell Biol.* *17*, 3202-3209.
- Midwood,K., Sacre,S., Piccinini,A.M., Inglis,J. et al., (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.* *15*, 774-780.
- Midwood,K.S. and Orend,G. (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun. Signal.* *3*, 287-310.
- Miner,J.H., Lewis,R.M., and Sanes,J.R. (1995). Molecular cloning of a novel laminin chain, alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol. Chem.* *270*, 28523-28526.

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 alpha5 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.

Miner,J.H. (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microsc. Res. Tech.* *71*, 349-356.

Mochizuka,A., Uehara,T., Nakamura,T., Kobayashi,Y., and Ota,H. (2007). Hyperplastic polyps and sessile serrated 'adenomas' of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem. Cell Biol.* *128*, 445-455.

Monteleone,G., Del Vecchio,B.G., Palmieri,G., Vavassori,P. et al., (2004). Induction and regulation of Smad7 in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* *126*, 674-682.

Morissette,M.C., Vachon-Beaudoin,G., Parent,J., Chakir,J., and Milot,J. (2008). Increased p53 level, Bax/Bcl-x(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema. *Am J Respir. Crit Care Med.* *178*, 240-247.

-N-

Nenci,A., Becker,C., Wullaert,A., Gareus,R. et al., (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* *446*, 557-561.

Nenutil,R., Smardova,J., Pavlova,S., Hanzelkova,Z. et al., (2005). Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol.* *207*, 251-259.

Neufert,C., Becker,C., and Neurath,M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* *2*, 1998-2004.

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.

Niessen,C.M., van der Raaij-Helmer MH, Hulsman,E.H., van der,N.R., Jonkman,M.F., and Sonnenberg,A. (1996). Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional

epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7), 1695-1706.

Niimi,T., Hayashi,Y., and Sekiguchi,K. (2003). Identification of an upstream enhancer in the mouse laminin alpha 1 gene defining its high level of expression in parietal endoderm cells. *J Biol. Chem.* 278, 9332-9338.

Nikolova,G., Jabs,N., Konstantinova,I., Domogatskaya,A. et al., (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev. Cell* 10, 397-405.

-O-

Offield,M.F., Jetton,T.L., Labosky,P.A., Ray,M., Stein,R.W., Magnuson,M.A., Hogan,B.L., and Wright,C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995.

Olive,K.P., Tuveson,D.A., Ruhe,Z.C., Yin,B., Willis,N.A., Bronson,R.T., Crowley,D., and Jacks,T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860.

Olson,T.S., Reuter,B.K., Scott,K.G., Morris,M.A. et al., (2006). The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp. Med.* 203, 541-552.

Orend,G. and Chiquet-Ehrismann,R. (2000). Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp. Cell Res.* 261, 104-110.

Orend,G. and Chiquet-Ehrismann,R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 244, 143-163.

Otte,J.M., Cario,E., and Podolsky,D.K. (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054-1070.

-P-

Papanikolaou,A., Shank,R.C., Delker,D.A., Povey,A., Cooper,D.P., and Rosenberg,D.W. (1998). Initial levels of azoxymethane-induced DNA methyl adducts are not predictive of tumor susceptibility in inbred mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 196-203.

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

Piccinni,S.A., Bolcato-Bellemin,A.L., Klein,A., Yang,V.W., Kedinger,M., Simon-Assmann,P., and Lefebvre,O. (2004). Kruppel-like factors regulate the Lamal gene encoding the laminin alpha1 chain. *J Biol. Chem.* 279, 9103-9114.

Pickert,G., Neufert,C., Leppkes,M., Zheng,Y. et al., (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp. Med.* 206, 1465-1472.

Podolsky,D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J Med.* 347, 417-429.

Pohlers,D., Brenmoehl,J., Loffler,I., Muller,C.K., Leipner,C., Schultze-Mosgau,S., Stallmach,A., Kinne,R.W., and Wolf,G. (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 746-756.

Potten,C.S., Booth,C., Tudor,G.L., Booth,D. et al., (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71, 28-41.

Pöschl,E., Schlotzer-Schrehardt,U., Brachvogel,B., Saito,K., Ninomiya,Y., and Mayer,U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619-1628.

Probstmeier,R., Martini,R., and Schachner,M. (1990). Expression of J1/tenascin in the crypt-villus unit of adult mouse small intestine: implications for its role in epithelial cell shedding. *Development* 109, 313-321.

-R-

Rahuel,C., Filipe,A., Ritie,L., El Nemer,W. et al., (2008). Genetic inactivation of the laminin alpha5 chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F393-F406.

Raschperger,E., Thyberg,J., Pettersson,S., Philipson,L., Fuxe,J., and Pettersson,R.F. (2006). The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp. Cell Res.* 312, 1566-1580.

Rebustini,I.T., Patel,V.N., Stewart,J.S., Layvey,A., Georges-Labouesse,E., Miner,J.H., and Hoffman,M.P. (2007). Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling. *Dev. Biol.* 308, 15-29.

Reis,C.A., David,L., Correa,P., Carneiro,F., de Bolos,C., Garcia,E., Mandel,U., Clausen,H., and Sobrinho-Simoes,M. (1999). Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression. *Cancer Res.* 59, 1003-1007.

Ren,F., Wang,B., Yue,T., Yun,E.Y., Ip,Y.T., and Jiang,J. (2010). Hippo signaling regulates Drosophila intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 21064-21069.

Riedl,S., Tandara,A., Reinshagen,M., Hinz,U., Faissner,A., Bodenmuller,H., Buhr,H.J., Herfarth,C., and Moller,P. (2001). Serum tenascin-C is an indicator of inflammatory bowel disease activity. *Int. J Colorectal Dis.* *16*, 285-291.

Rio,M.C., Chenard,M.P., Wolf,C., Marcellin,L., Tomasetto,C., Lathe,R., Bellocq,J.P., and Chambon,P. (1991). Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* *100*, 375-379.

Ritié-Pertusa L. (2008). Recherche du rôle de la chaîne $\alpha 5$ de laminine dans l'intestin normal et pathologique. Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I.

Rivera-Nieves,J., Bamias,G., Vidrich,A., Marini,M., Pizarro,T.T., McDuffie,M.J., Moskaluk,C.A., Cohn,S.M., and Cominelli,F. (2003). Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* *124*, 972-982.

Roig,A.I., Eskiocak,U., Hight,S.K., Kim,S.B., Delgado,O., Souza,R.F., Spechler,S.J., Wright,W.E., and Shay,J.W. (2010). Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate in vitro. *Gastroenterology* *138*, 1012-1021.

Rooney,J.E., Gurple,P.B., and Burkin,D.J. (2009). Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 7991-7996.

Rozario,T. and DeSimone,D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* *341*, 126-140.

Ruegg,C.R., Chiquet-Ehrismann,R., and Alkan,S.S. (1989). Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 7437-7441.

Rustgi,A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* *21*, 2525-2538.

Ryan,M.C., Lee,K., Miyashita,Y., and Carter,W.G. (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J Cell Biol.* *145*, 1309-1323.

Ryschich,E., Schmidt,J., Hammerling,G.J., Klar,E., and Ganss,R. (2002). Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. *Int. J Cancer* *97*, 719-725.

-S-

Saga,Y., Yagi,T., Ikawa,Y., Sakakura,T., and Aizawa,S. (1992). Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* 6, 1821-1831.

Sancho,E., Batlle,E., and Clevers,H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 695-723.

Sato,T., Vries,R.G., Snippert,H.J., van de,W.M. et al., (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Scherberich,A., Tucker,R.P., Degen,M., Brown-Luedi,M., Andres,A.C., and Chiquet-Ehrismann,R. (2005). Tenascin-W is found in malignant mammary tumors, promotes alpha8 integrin-dependent motility and requires p38MAPK activity for BMP-2 and TNF-alpha induced expression in vitro. *Oncogene* 24, 1525-1532.

Scoville,D.H., Sato,T., He,X.C., and Li,L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134, 849-864.

Shattil,S.J., Kim,C., and Ginsberg,M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 288-300.

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.

Simon-Assmann,P., Spenle C, Lefebvre O, and Kedinger M (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. In *Molecular Biology of Digestive Organs*, Conn P.M. and Kaestner K., eds. Academic Press).

Simon-Assmann,P. and Kedinger,M. (1993). Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin. Cell Biol.* 4, 221-230.

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., 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.

Simon-Assmann,P., Bolcato-Bellemin,A.L., Klein,A., and Kedinger,M. (2009). Tissue recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. *Methods Mol. Biol.* 522, 309-318.

Simon-Assmann,P., Orend,G., Mammadova-Bach,E., Spenle C., and Lefebvre O. (2010). Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol. Revue sous presse*.

Soriano,P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* *21*, 70-71.

Steinhardt,A.A., Gayyed,M.F., Klein,A.P., Dong,J., Maitra,A., Pan,D., Montgomery,E.A., and Anders,R.A. (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum. Pathol.* *39*, 1582-1589.

Strutz,F., Okada,H., Lo,C.W., Danoff,T., Carone,R.L., Tomaszewski,J.E., and Neilson,E.G. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* *130*, 393-405.

Sugimoto,K. (2008). Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* *14*, 5110-5114.

Sundberg,J.P., Elson,C.O., Bedigian,H., and Birkenmeier,E.H. (1994). Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* *107*, 1726-1735.

Swidsinski,A., Sydora,B.C., Doerffel,Y., Loening-Baucke,V., Vaneechoutte,M., Lupicki,M., Scholze,J., Lochs,H., and Dieleman,L.A. (2007). Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 963-970.

Swidsinski,A., Loening-Baucke,V., and Herber,A. (2009). Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol.* *60 Suppl 6*, 61-71.

-T-

Takada,Y., Ye,X., and Simon,S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* *8*, 215.

Tan,K. and Lawler,J. (2009). The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J Cell Commun. Signal.* *3*, 177-187.

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.

Tenesa,A. and Dunlop,M.G. (2009). New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 353-358.

Terzic,J., Grivennikov,S., Karin,E., and Karin,M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* *138*, 2101-2114.

Thiery,J.P., Acloque,H., Huang,R.Y., and Nieto,M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* *139*, 871-890.

Thyboll,J., Kortesmaa,J., Cao,R., Soininen,R. et al., (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol. Cell Biol.* 22, 1194-1202.

Todaro,M., Francipane,M.G., Medema,J.P., and Stassi,G. (2010). Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 138, 2151-2162.

Tsafrir,D., Bacolod,M., Selvanayagam,Z., Tsafrir,I. et al., (2006). Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 2129-2137.

Tsubota,Y., Ogawa,T., Oyanagi,J., Nagashima,Y., and Miyazaki,K. (2010). Expression of laminin gamma2 chain monomer enhances invasive growth of human carcinoma cells in vivo. *Int. J Cancer* 127, 2031-2041.

Tunggal,P., Smyth,N., Paulsson,M., and Ott,M.C. (2000). Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc. Res. Tech.* 51, 214-227.

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.

-V-

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

Van der Sluis,M., De Koning,B.A., De Bruijn,A.C., Velcich,A. et al., (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117-129.

Velcich,A., Yang,W., Heyer,J., Fragale,A. et al., (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295, 1726-1729.

Virtanen,I., Gullberg,D., Rissanen,J., Kivilaakso,E., Kiviluoto,T., Laitinen,L.A., Lehto,V.P., and Ekblom,P. (2000). Laminin alpha1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp. Cell Res.* 257, 298-309.

-W-

Wells,J.M. and Melton,D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 393-410.

Whitehead,R.H. and Robinson,P.S. (2009). Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from the intestinal tissue of adult normal and transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 296, G455-G460.

Wicking,C., Simms,L.A., Evans,T., Walsh,M. et al., (1998). CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* 17, 657-659.

Williamson,R.A., Henry,M.D., Daniels,K.J., Hrstka,R.F., Lee,J.C., Sunada,Y., Ibraghimov-Beskrovnaya,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.

Wirtz,S., Neufert,C., Weigmann,B., and Neurath,M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2, 541-546.

Wright,N.A., Pike,C., and Elia,G. (1990). Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 343, 82-85.

Wullaert,A. (2010). Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. *Int. J Med. Microbiol.* 300, 49-56.

-X-

Xu,Y. (2006). DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 261-270.

-Y-

Yang,X., Letterio,J.J., Lechleider,R.J., Chen,L., Hayman,R., Gu,H., Roberts,A.B., and Deng,C. (1999). Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J* 18, 1280-1291.

Yasugi,S. and Mizuno,T. (2008). Molecular analysis of endoderm regionalization. *Dev. Growth Differ.* 50 *Suppl 1*, S79-S96.

Yurchenco,P.D. and Patton,B.L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des* 15, 1277-1294.

-Z-

Zhu,L., Gibson,P., Currel,D.S., Tong,Y. et al., (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607.

Annexes

I. Communications aux congrès

Journées Francophones de Pathologie Digestive, 8-12 Mars 2008

J. Lacroute, C. Spenlé, A. Mechine-Neuville, C. Meyer, M. Kedinger, P. Simon-Assmann, B. Duclos : **Expression des chaînes de laminines (Ln) et tenascines dans le côlon de maladies de Crohn (MC) et de rectocolites hémorragiques (RCH)** – Poster

XXI Federation of European Connective Tissue Societies Meeting, Marseille, 8-13 Juillet 2008

C. Spenlé, J. Lacroute, A. Mechine-Neuville, C. Meyer, M. Kedinger, B. Duclos, G. Orend, P. Simon-Assmann : **Laminins and Tenascin-C expressions are modified in inflammatory bowel diseases** – Poster

Paul Basset Memorial Meeting - Early Tumor Invasion, 30 Janvier 2009

- P. Simon-Assmann, C. Spenlé, I. Jivkov, A. Mechine-Neuville, J. Lacroute, B. Duclos, O. Lefebvre: **Defining the role of laminins in the local invasive process in colorectal tumors** – Poster
- Gasser, C. Spenlé, K-P Janssen, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, A. Mechine-Neuville, J. Mutterer, D. Guenot, G. Orend: **Expression and organization of tenascins and laminins in the microenvironment of human and mouse tumors of intestinal and pancreatic origin** – Poster

XXVIIème réunion du CECED (Club d'Étude des Cellules Epithéliales Digestives), Strasbourg 19-20 mars 2009

C. Spenlé, J. Lacroute, A. Mechine-Neuville, C. Meyer, M. Kedinger, B. Duclos, G. Orend, P. Simon-Assmann : **Dérégulation des laminines et de la ténascine-C dans les maladies intestinales chroniques de l'intestin**- communication orale

Second Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Reims 3-5 juin 2009

C. Spenlé, J. Lacroute, A. Méchine-Neuville, C. Meyer, M. Kedinger, G. Orend, D. Gullberg, B. Duclos, P. Simon-Assmann : **Deregulation of laminins, tenascin-C and p53 expression in inflammatory bowel diseases**- Poster (prix de poster)

II. Revue 1: The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions

(In Molecular Biology of Digestive Organs, Conn P.M. and Kaestner K., eds. Academic Press)

The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions

P. Simon-Assmann, C. Spenle, O. Lefebvre, M. Kedinger*

Inserm, U682, Strasbourg, F-67200 France ; Univ Strasbourg, UMR-S682, Strasbourg, F-67081 France

* Corresponding author, phone: 33 (0)3 88 27 53 52, Fax: 33 (0)3 88 26 35 38

E-mail: michele.kedinger@inserm.fr

Authors:

P. Simon-Assmann, Phone: 33 (0)3 88 27 53 56, Fax: 33 (0)3 88 26 35 38

E-mail: patricia.simon-assmann@inserm.u-strasbg.fr

C. Spenle, phone: 33 (0)3 88 27 53 56, Fax: 33 (0)3 88 26 35 38

E-mail: caroline.spenle@inserm.u-strasbg.fr

O. Lefebvre, phone: 33 (0)3 88 27 53 56, Fax: 33 (0)3 88 26 35 38

E-mail: olivier.lefebvre@inserm.fr

Running title: Basement membrane and cell interactions

Introduction

I - Models of epithelial-mesenchymal interactions in developing intestine

Focus on caudal Cdx genes.....

II - The intestinal basement membrane

Components and organization of the basement membrane

Cellular origin of the basement membrane molecules during intestinal development

III - Influence of the extracellular matrix in epithelial differentiation

Epithelial/mesenchymal co-cultures: influence of differentiating factors

Benefit of a co-culture model of wound healing

Native extracellular matrix and laminin coatings leading to epithelial cell differentiation.....

IV - Interplay between basement membrane molecules and transcription factors

Cdx2, a target of extracellular matrix molecules.....

Transcriptional factors as regulators of laminin gene expression

The lama1 gene promoter

Regulation of the laminin γ 2 and α 3 chains.....

V - Involvement of basement membrane proteins at the epithelial-mesenchymal interface in the intestine: use of knock-out mice

(a) Deletion of lama5 induces multiple defects

One characteristic example, the hair defect.....

Defects linked to the absence of lama5 in the intestinal tissue

Rescue experiments in intestine.....

Compensation processes occur in both α 5-null and in KO/Tg intestines.....

(b) Deletion of the lama1 gene.....

Three different models: similar conclusions

Overcoming early lethality.....

The retinal phenotype.....

(c) Deletion of the lama2, lama3 and lama4 genes encoding $\alpha 2$, $\alpha 3$, and $\alpha 4$ laminin chains

VI- Genetic inactivation of laminin receptors leads to intestinal abnormalities

Conclusion and future directions.....

Abstract

Intestinal development is a process of continuous dynamic bidirectional crosstalk between epithelial and underlying mesenchymal cells. This crosstalk is mediated by well-dissected signaling pathways. Another crucial actor in the epithelio-mesenchymal interactions is the stromal microenvironment, composed of extracellular matrix molecules. Among them, the basement membrane molecules are secreted by the epithelium and mesenchyme in a complementary manner. These molecules signal back to the cells via the integrins or other specific receptors. In this review we will mainly focus on the basement membrane molecules, particularly laminins. The major basement membrane molecules are organized in a complex molecular network which is highly variable among organs. Cell culture, co-culture, and grafting models have been of great interest for understanding the importance of these molecules. Mouse gene ablation of laminin chains are interesting models which often lead to embryonic death and are frequently accompanied by compensatory processes. Overall, the basement membrane molecules are crucial in the careful maintenance of intestinal homeostasis.

Key words: intestine, development, cell interactions, basement membrane, laminins, experimental models, gene ablation.

Introduction

The intestinal epithelium derives from the mid and posterior parts of the definitive endoderm (midgut and hindgut), which itself originates from the ingression of primitive streak cells at gastrulation. Specification of the presumptive intestinal endoderm is driven by interactions with the lateral mesoderm. Later, morphogenesis of the gut generates the single-layer columnar epithelium, situated above the lamina propria myofibroblasts, from which it is separated by a basement membrane, which is a specialization of the extracellular matrix. The basolateral membrane of the epithelial, as well as that of the mesenchyme-derived cells, carries receptors of basement membrane molecules. Gut development is characterized by morphogenetic processes –progressive outgrowth of the villi, and later on, downgrowth of the crypts in the stromal tissue. Eventually, both epithelial and mesenchyme-derived compartments acquire their definitive morphological architecture (crypt-villus or colonic glands and muscle layers, respectively) and their digestive functions.

These developmental steps leading to the adult stage are controlled by crucial pathways emerging from one or the other cell compartment, allowing morphogenetic processes and differentiation of both epithelial and mesenchymal cells. These molecular players include the Wnt, Hedgehog, Notch, PI3K, and BMP signaling molecules, whose pathways have been dissected extensively in a number of animal species but are still not completely elucidated (1-5). In addition, the less well known extracellular matrix molecules, among which the basement membrane molecules –laminins, type IV collagen, nidogen, and perlecan– are secreted by both epithelial and mesenchymal compartments in a complementary manner. These molecules signal back to the cells via the integrins or other specific receptors – the α -dystroglycan or the Lu/BCAM (Lutheran blood group and basal cell adhesion molecule)– leading to architectural or functional changes of both epithelial and mesenchymal cells. Compelling evidence of the involvement of basement membrane molecules and of their receptors in intestinal epithelial cell homeostasis comes from *in vitro* co-culture models and gene ablation mice models.

In this chapter, we will describe (i) *in vitro* and *in vivo* models that help to elucidate the interactions between epithelial and mesenchymal tissues, (ii) the composition and organization of the intestinal basement membrane, as well as the tissular origin (epithelial or mesenchymal) of the individual molecules, (iii) the influence of the extracellular matrix in epithelial differentiation, (iv) the potential interplay between the basement membrane and transcription factors, (v) germinal gene ablation experiments of laminin α chains and of the main receptors of the basement membrane molecules and their consequences.

I- Models of epithelial-mesenchymal interactions in developing intestine

Early experiments demonstrated that interactions between mesenchyme and epithelium were required for normal morphogenesis in various organs. In the gut, morphological differentiation is controlled by the limited self-differentiation of the endodermal tissue, by the inductive action of the mesenchyme and by the reactivity of the endoderm to the mesenchymal induction (6-9). Developmental biologists at the “Collège de France” including Katy Haffen have performed various types of recombination experiments between endoderm and mesenchyme of fetal intestines from different species (chick, mouse, or rat) before any sign of differentiation. For example, grafted tissue recombinations of proximo-distal segments of the fetal gut (small intestinal mesenchyme associated to colon endoderm) demonstrate that sucrase-isomaltase has been induced in the colon epithelium under the influence of small intestinal mesenchyme, which shows the major influence of the mesenchyme (10) (**Figure 1**). Another type of recombination experiment between intact mouse mesenchyme and undifferentiated rat intestinal epithelial cells (IEC) (11) led us to

show for the first time that the mesenchyme was able to induce a villus morphogenesis comprising all epithelial cell types in the grafting conditions; this experiment proved that pluripotent stem cells were present in the IEC cell line, but lacked an adequate microenvironment in culture (12).

Overall, these experiments have garnered a huge amount of information concerning the instructive or inductive potentialities of the mesenchyme or endoderm for the onset of brush-border enzymes and the capacity of the colon or gastric endoderm to be intestinalized by the small intestinal mesenchyme (12-15). Such recombination and/or grafting techniques also benefited to several teams who performed fruitful experiments (2;16;17).

Focus on caudal Cdx genes

Among the transcription factors involved in epithelial-mesenchymal interactions, a great interest has been generated in the caudal transcription factors Cdx, as these genes are involved in intestinal homeostasis. Cdx1-null mice are viable and do not show major intestinal phenotype; however they induce faint dose-dependent modifications of the expression of the paralogous gene Cdx2 (18;19). The germinal gene ablation of Cdx2 led to early lethality before the onset of endoderm development, and the heterozygous mice formed polyp-like heteroplasia in which the remaining Cdx2 allele is lost (20-22).

In epithelial-mesenchymal recombinants composed of proximal or distal segments of the small intestinal mesenchyme, we observed that the level of Cdx gene expression in the associated colon endoderm was decreased, demonstrating the influence of the small intestinal mesenchyme on colonic epithelial cells (23). Interestingly, Cdx2-expressing cells grafted under the skin of nude mice maintained their expression; in contrast, when the cells were injected in the caecum wall, Cdx2 was lost, underlying the influence of the tissue microenvironment in the regulation of Cdx2 (24) (**Figure 1**).

Recently, Klaus Kaestner's laboratory (25) published a very interesting paper based on a conditional ablation of Cdx2 using a Foxa3-Cre line, which led to severely affected intestinal growth and colon dysgenesis; indeed, the colon failed to form. In addition to these important morphogenetic and functional failures, there was a significant activation of esophageal genes (primarily keratin genes) while specific intestinal genes were extinguished in the posterior Cdx2-mutant intestine. There was also a shift of the main intestinal transcription factors to anterior transcription factors. Gao and colleagues (25) pointed to the important alterations of epithelial-mesenchymal cell interactions in the intestine of the Cdx2-deficient mice. The Wnt and Hedgehog signaling pathways in particular were affected. This was obvious from the ectopic activation of Wnt10a, other Wnts, and Wnt target genes in the caudal intestine of the mutants. IHH and SHH expression were reduced, which may explain the presence of the expanded smooth muscle layers observed in the mutant proximal intestine.

Altogether, Cdx2 is a master regulator in the posterior endoderm with a central role in the establishment of intestinal identity. Cdx2 is also submitted to a crucial control by epithelial-mesenchymal cell interactions via at least two major signaling pathways, Wnt and Hh, which control the proliferation and homeostasis of the intestinal epithelium, myofibroblasts and smooth muscle layers.

II- The intestinal basement membrane

Components and organization of the basement membrane

Basement membranes are sheet-like structures that separate cells (particularly epithelial) from the underlying or surrounding connective tissue (**Figure 2**). These basement membrane molecules also surround muscle cells, Schwann cells, and fat cells. They contribute to tissue organization, stability, and differentiation. These matrices are assembled as polymers of laminins and type IV collagen that are linked together by nidogens and heparan sulphate proteoglycan (perlecan). These four classes of basement membrane molecules can be visualized in numerous organs by immunostaining using specific antibodies. Laminins are major components of the basement membrane and are vital for many physiological functions. A great wealth of data on laminins is available in the literature and strengthens their major role in embryonic development and organogenesis (for reviews see (26-28)). Here we will provide an overview of their structure and classification, and we will describe in detail their expression, cellular origin, and function in the intestine.

Laminins are heterotrimeric proteins composed of one α , one β , and one γ chain. In vertebrates, five α , three β , and three γ chains have been identified that represent distinct gene products. The laminin family of proteins has been reclassified recently according to their subunit composition. Molecular characterization, availability, and use of specific antibodies have allowed demonstration of 15 laminin isoforms to date (29) (**Figure 2**). These isoforms are often expressed in a tissue- and developmentally-specific manner. Genetic diseases in humans such as congenital muscular dystrophy, junctional epidermolysis bullosa, and Pierson syndrome are linked to mutations in genes encoding laminin $\alpha 2$ chain, constitutive chains of laminin-332, and laminin $\beta 2$ chain, respectively (for reviews see (27;28)). Through interactions with several cell-surface receptors including integrins, syndecans, dystroglycans, or Lutheran, basement membranes are able to drive different signaling pathways to the cell and lead to specific functions (28).

Immunocytochemical and *in situ* hybridization studies indicate that almost all subunits (except $\gamma 3$ chain) are present in the intestinal basement membrane either at the base of epithelial cells or surrounding muscle cells. The co-distribution at the subepithelial basement membrane of certain chains either at the crypt or villus level, demonstrate the coexistence of several laminin trimers in the adult intestine. So far, the laminin isoforms that are potentially expressed in the mature organ can be classified as basement membrane epithelial crypt markers such as laminin-111 and laminin-211 (due to the presence of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ in the crypt region) and as basement membrane epithelial villus markers such as laminin-332 and laminin-511 (identified by $\gamma 2$ and $\alpha 5$ chains) (30-32). In the adult muscle coat, most of the laminin chains are expressed, with a predominating expression of laminin $\alpha 4$ and $\alpha 5$ -containing isoforms (33) (**Figure 3A**). At early phases of development, the embryonic murine intestine is composed of the inner endoderm surrounded by the mesenchyme. The epithelial basement membrane is located between the two and contains fewer laminin isoforms, as shown by the restricted expression of some laminin α chains (33) and (31), in particular $\alpha 1$ and $\alpha 5$ chains while the $\beta 2/\gamma 2$ chains are not expressed. Therefore, laminin-111 and laminin-511 are the two major isoforms found in the embryonic intestine. Interestingly, laminin-211 appears at birth as visualized by the presence of $\alpha 2$ chain, restricted to the crypt region where cells proliferate and Paneth cells differentiate (32-34).

Cellular origin of the BM molecules during intestinal development

The precise mechanisms by which cells synthesize and deposit their matrices are not yet fully understood. More than ten different laminin gene products contribute to basement

membrane assembly which depends upon the stage or the physiological situation of the tissue. This process requires not only a strict transcriptional regulation of the genes (see section IV) but also an adaptation on the part of the tissue for controlling the secretion and assembly of the various basement membrane molecules out of the cells. In this regard, we could show that the basement membrane located at the epithelial/mesenchymal interface in the intestine is assembled from components that are derived from both cell types and according a precise chronology. To determine the cellular origin of this basement membrane, we used the strategy previously mentioned as interspecies associations, furthering our understanding of the necessity of epithelial/mesenchymal interactions in the gut. We combined the creation of interspecies embryonic tissue recombinants (mostly chick/mouse), grafting, and application of species-specific antibodies on the developed hybrid intestines (35). We were able to demonstrate that the production (and more importantly the deposition at the interface between epithelial and mesenchymal cells) of the basement membrane molecules result from a sequential process that requires cross-talk between the two tissue compartments (**Figure 3B**). Whatever the developmental state of the basement membrane, laminin $\beta 1$ and $\gamma 1$ chains have a dual epithelial and mesenchymal origin while perlecan and nidogen are strict epithelial or mesenchymal products, respectively. Some molecules are produced by either the epithelial or the mesenchymal cells depending upon the differentiation stage of the intestines. Indeed, at the early phases of basement membrane formation, $\alpha 1$ and $\alpha 5$ chains of laminins, collagen IV are derived from the endoderm, while at later stage, when the basement membrane is more stabilized, deposition by mesenchymal cells is more important. This is exemplified by three laminin α chains ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$) as well as by collagen IV. In laminin $\alpha 5$ -deficient mice, a compensation process takes place in which $\alpha 2$ and $\alpha 4$ laminins are deposited precociously or ectopically by mesenchymal cells (30;33;36) and (37).

III- Influence of the extracellular matrix in epithelial differentiation

Epithelial/mesenchymal co-cultures: influence of differentiating factors

Endoderm/mesenchyme or epithelial/fibroblast co-cultures provide informative models for a large number of intestinal developmental aspects. In the early 1980s, Susan Henning (as well as our group) focused on the role of glucocorticoids (GC) and retinoic acid (RA) in the maturation of the intestine (4;38;39). The use of mesenchymal/endodermal cell co-cultures confirmed the maturation and differentiation effects of GC and RA on the endodermal cells, and emphasized the necessity of the mesenchymal tissue in the hormonal response. In a “princeps” experiment, we showed that both GC and RA induced the deposition of laminin-111 at the interface between epithelial and mesenchymal cells and triggered the polarization and differentiation of the epithelial cells. The direct link between laminin deposition and epithelial differentiation was demonstrated by the inhibition of lactase expression at the brush border level in the presence of anti-laminin antibodies in dexamethasone-treated co-cultures (36;40;41) (**Figure 4A**). Using this co-culture system, we could also demonstrate the plasticity of fetal skin fibroblasts that are able to differentiate into smooth muscle cells under the influence of intestinal endoderms (42). Furthermore, grafted co-cultures of endoderms with two different postnatal intestinal mesenchymal cell lines showed that, depending upon their respective intrinsic properties, they grew into either normal intestinal crypt-villus structures surrounded by a muscular coat or into structures invading the connective tissue, with thin and less structured muscle layers. Interestingly, measurements of laminin-111 in both mesenchymal cell cultures showed that the cell line which generated the grafts displaying normal intestinal crypt-villus morphology produced nearly twice as much laminin than the grafts composed of the invading structures. (43;44) (**Figure 1B**).

Benefit of a co-culture model of wound healing

The intestinal mucosa is constantly subjected to mucosal injuries that must heal to maintain normal function. Therefore it is important to define regulators of the epithelial restitution, a process required in inflammatory bowel diseases. As a model of wound healing, Beaulieu and collaborators (45) set up a co-culture model for the study of wound healing using a co-culture system of Caco2 cells on top of human intestinal myofibroblasts (HIM cell line). The Caco2/15-HIM co-cultures generate a basement membrane-like structure that contains components found in the *in vivo* subepithelial basement membrane. To investigate the mechanisms of restitution (wound healing assays) small lesions were generated in the epithelial layer without disturbing the mesenchymal cell layer. The authors showed that the restitution of the lesion is improved in the co-culture conditions compared to Caco2/15 cells alone. Most importantly, this epithelial-mesenchymal co-culture model demonstrated that wound healing occurs in parallel with a strong increase in expression and deposition of the basement membrane molecules laminin-511, type IV collagen, and laminin-332 at the base of the migratory cells, which probably participates in the wound healing. Furthermore, the addition of soluble type I collagen or human plasma fibronectin favors the epithelial cell restitution (45). The involvement of extracellular matrix molecules in Crohn's disease patients is exemplified by the finding of a reorganization of the crypt basement membrane in inflamed segments, in particular of laminins in both small intestine (46) and colon (Ritje and Spenle et al. personal communication). In parallel, alteration in pericryptal fibroblasts was noted in inflamed Crohn's disease patients, which suggests a myofibroblast dedifferentiation process. (47).

Native extracellular matrix and laminin coatings leading to epithelial cell differentiation

In order to study the effect of cell-extracellular matrix interaction on cell-cell adhesion and cell polarization, human intestinal epithelial Caco2 cells were cultured on various native extracellular matrices derived from either epithelial or mesenchymal cells. Data showed that the level of epithelial cell differentiation assessed by the expression of I-FABP and apolipoprotein genes varied according to the origin of the extracellular matrix, the most efficient being the native laminin-332-rich extracellular matrix deposited by the HT29-MTX cells (adapted to methotrexate) (48). This shows that a matrix secreted solely by mesenchyme-derived cells is not sufficient by itself to trigger maximal differentiation and further point to the necessity of a complex extracellular matrix produced by both epithelial and mesenchymal cells. However, native laminin-332, but also collagen IV or laminin-221, are able to trigger the lateral targeting of E-cadherin at the cell-cell junction, suggesting a common pathway of induction through β 1-integrin receptors. These data (49), together with those of Chartier and colleagues (50), conducted on another HT29 cell line (one that depicts other subsets of integrins) clearly demonstrate that basement membrane molecules mediate, via integrins, functional cell polarization through complexes of E-cadherin and actin. Additionally, it was shown that PI3K activation plays a key role in this cross-talk that signals through Rac1b activation to control adherent junction assembly (50).

A proteomic approach was utilized in order to discover which nuclear proteins that are differentially expressed as epithelial cell differentiation proceeds or by cells cultured on laminin-111. Among the differentially-expressed genes, we found nucleolin, nucleophosmin, and members of the hnRNP (heterogenous nuclear RNA) family (51;52). Interestingly, this approach pointed out the crucial role of nucleolin, a major nucleolar protein, which was mostly present in the nuclei during the proliferative stage of the Caco2 cells, but located at the cell membrane in differentiated cells. Similarly, nucleolin shifted from the nucleus to the cell membrane of cells cultured on laminin-111, whereas no such labeling could be seen in the cells cultured on laminin-511. Nucleolin shRNAs experiments mimicked the effect of

laminin-111 as it resulted in the induction of cell polarization and differentiation. Finally, this specific effect of laminin-111 on Caco2 cells (induction of sucrase-isomaltase and membrane localization of nucleolin) is mediated by a β 1-integrin-dependent cascade which implicates activation of the p38 MAPK pathway (53) (**Figure 5**).

IV- Interplay between basement membrane molecules and transcription factors

Cdx2, a target of extracellular molecules

Laminin-111 is crucial for epithelial polarization and differentiation in various organs (54). In the intestine, inhibition of laminin α 1 chain by anti-sense RNA in Caco2 cell clones leads to an incorrect secretion of the β 1 and γ 1 chains. In addition, in the anti-sense Caco2/mesenchymal cell co-cultures, type IV collagen failed to be deposited and brush-border markers were strikingly decreased, or even absent. Laminin α 1 anti-sense mRNA led, via an unknown mechanism, to a loss of laminin α 5 chain (55) (**Figure 4B**). Interestingly, a positive correlation between the level of laminin- α 1 chain mRNA in laminin α 1 anti-sense clones, Cdx2, and sucrase-isomaltase was shown (55;56). Similarly, Caco2 cells seeded on laminin-111 rapidly induced differentiation processes, including expression of Cdx2 (53). Furthermore, Cdx2 overexpression in Caco2 cells modified the cell-substratum interactions with a decay of integrin β 1 and stimulation of integrin β 4 and α 6 subunits at the ventral side of the cells. A similar shift in integrin expression was observed in Caco2 cells cultured on laminin-111. These results display a link between a key intestine transcription factor (Cdx2) and the extracellular matrix related to intestinal epithelial polarization and differentiation (55;56) (**Figure 5**).

Brabletz and collaborators observed that most of the cells in primary colorectal tumors which are still surrounded by a laminin-containing basement membrane expressed Cdx2 (57). In contrast, the cells near the margin of the tumors, where interruptions or lack of the basement membrane allow cell contact with a collagen I matrix, lost Cdx2 and E-cadherin, but acquired nuclear β -catenin. The invasive cells also overexpressed laminin- γ 2 chains intracellularly, while *LAMA3* was transcriptionally downregulated (see section below: Regulation of laminin γ 2 and α 3 chains). Interestingly, the authors showed *in vitro* that when colorectal cancer cells are in direct contact with collagen I, Cdx2 mRNA was downregulated in different cell lines, and concomitantly the cells underwent an epithelial-mesenchymal transition.

Transcriptional factors as regulators of laminin gene expression

In this section, we will focus on three laminin chains: laminin α 1, laminin α 3 and laminin γ 2 chains. The genes and promoter elements of these chains have been characterized and, more importantly, have proved to be functional in an intestinal context. Information on laminin promoters in a more general context is discussed in a preceding review (58).

The lama1 gene promoter

The relevance of studying the regulation of the α 1 chain of laminin is related to its restricted tissue distribution (59) and to the fact that this chain is thought to be the limiting factor of secretion of laminin-111 (60). Proximal regions of the human *LAMA1* and of the mouse *lama1* gene promoters (encoding the α 1 chain) display high degrees of sequence conservation and lack TATA and CCAAT box elements like other laminin genes (61;62) (**Figure 6A**). The characterization of the proximal promoter region of the mouse *lama1* gene showed that a GC-rich motif for the binding of Sp1 transcription factors (used by many

eukaryotic gene promoters) is crucial for the basal transcriptional activity of the promoter. Additionally, this proximal region also includes a Krüppel-like element located 24 bp upstream of the Sp1 site. Interestingly, expression of the Krüppel-like factors KLF4 and KLF5 in intestinal epithelial cells had contrasting effects on the *lama1* gene promoter. It is worth noting that the *in vivo* differential expression of the two Krüppel factors correlates very well with the effects of KLF/*lama1* promoter cotransfections studies. KLF5, which acts positively on the promoter, is expressed in the proliferative cell compartment of the adult intestine, where laminin α 1 chain protein expression is restricted. On the other hand, KLF4 expressed in the post-mitotic cells lining the villi (63) negatively regulates the *lama1* promoter. Niimi and colleagues (64;65) identified a sequence in the 5'-flanking region that acts as a parietal endodermal cells enhancer. They determined that transcription of the mouse *lama1* gene during differentiation of parietal endoderm-like F9 cells is controlled by the ubiquitous factors SP1/SP3 and NF-Y, and the parietal endoderm-specific factors SOX7 and SOX17. They hypothesize that SOX7 or SOX17 may form multiprotein complexes with SP1/SP3 and NF-Y on the *lama1* enhancer *in vivo*. Expression of Sox17 was observed at the mRNA level in normal human gastrointestinal tract (66) and Sox17-null embryos lack the definitive endoderm lining the embryonic gut (67), suggesting this gene's possible involvement in regulation of normal gut physiology through laminin-111.

As for the mouse *lama1* gene, the SP family of transcription factors and Krüppel-like factors were shown to regulate the human *LAMA1* promoter (62). However, in JAR choriocarcinoma cells, KLF4 and KLF6 activate the transcription of the human *LAMA1* gene, while in the intestine, KLF4 negatively regulates the promoter. This means that transcription factors could regulate the promoter activity differentially depending upon the cellular context.

Regulation of the laminin γ 2 and α 3 chains

Laminin-332 plays an important role in adhesion and migration, according to *in vivo* models (68). This is exemplified by the fact that in the skin and the gut, laminin-332 (containing the γ 2 chain) is linked to adhesive hemidesmosomal complexes (69;70), while in colon cancer, this laminin isoform is localized intracellularly in cells positioned at the invasive front of the tumors (57). Furthermore, our data showing that the laminin γ 2 chain is expressed sequentially by epithelial cells and then fibroblasts during basement membrane formation argue for its controlled timed-production at the transcriptional level (70). The analysis of a 2.5-kb promoter region of the murine gene encoding laminin γ 2 chain showed that the 1.2-kb *lamc2* fragment upstream of the transcriptional site can direct an epithelial-specific expression of the gene (71) (**Figure 6B**).

The goal was then to define the regulatory elements implicated in cell migration. A migration-related element was identified on the promoter of the human *LAMC2* that narrowed down to nucleotides -613 and +55 (72). Olsen and colleagues (71) showed that the stimulatory effect of HGF/scatter factor on laminin γ 2 chain is mediated by activation of the transcription factor JunD binding to an AP-1 site close to the transcription-initiation site of the promoter. Interestingly, a synergistic activation of the human *LAMC2* gene was shown due to the convergence of HGF and Wnt signaling pathways. Wnt signals activate the promoter via β -catenin and TCF4 complexes binding to two sites placed upstream and downstream of the 5' AP1 site (73). The loss of the tumor-suppressor gene APC in murine intestinal epithelium, which leads to the nuclear localization of β -catenin, was shown to upregulate laminin γ 2 chain, which confirms that *lamc2* is a direct Wnt target (74). During tumor progression, it was shown that there is a transient loss of basement membrane concomitantly to an epithelial-mesenchymal transition. During this process, it was shown that a member of the snail family of transcription factors called ZEB1 (zinc-finger-enhancer protein 1) leads to an upregulation

of *LAMC2* expression, which is congruent with the strong overexpression and pro-migratory role of this basement membrane molecule in invading tumor cells (75).

The transient loss of the BM at the invasive front of the tumors is also linked to the downregulation of the **laminin $\alpha 3$ chain**. Of note is the loss of *LAMA3* expression in invasive areas and its re-expression in metastases (75). It was demonstrated in a *LAMA3* promoter study that ZEB1, as well as actors of the epithelial mesenchymal transition such as Snail or Slug, are crucial repressors of the *LAMA3* gene. Interestingly, the Z-boxes able to bind ZEB1 are localized in a region with high homology between humans and mice. A dominant-negative form of ZEB1 activates the *LAMA3* gene promoter and retroviral shRNA specific for ZEB1 restores the epithelial phenotype of cells assessed by the upregulation of membrane E-Cadherin and the increased laminin-332 secretion into the extracellular matrix (75).

TGF β belongs to a class of cytokines that stimulate laminin-332 expression (for a review see (58)). They act on cells primarily via the intracellular Smad proteins, such as Smad3 and Smad4. When translocated to the nucleus, they function as DNA-binding transcriptional activators (76). A synergistic effect between TGF β and HGF with respect to *lamc2* has been described, suggesting a Smad3-responsive region (between positions -212 and -169) and leading to an intracellular accumulation of the laminin $\gamma 2$ chain (77). Smad4, a tumor suppressor gene involved in carcinogenesis, functions by itself as a positive regulator of all three laminin chains of laminin-332 (78). This action is mediated by three different mechanisms: 1) the direct binding of Smad4 to a functional Smad-binding element site, mechanism only operative in the *LAMA3* promoter; 2) binding of Smad4 to AP1 (and SP1) sites in the promoters of the three genes encoding laminin-332, presumably via interactions with AP1 proteins; and 3) Smad4 mediating transcriptional induction of AP1 factors (79). These data show that the molecular mechanisms are divergent between the different promoters encoding laminin-332, a notion which has been strengthened by Spaderna and colleagues (75). Loss of Smad4 has been associated with the acquisition of invasiveness. In Smad4-deficient cells, TNF α can induce expression of laminin $\gamma 2$ chain, followed by the release of $\gamma 2$ into the medium (rather than causing an intracellular accumulation). This soluble $\gamma 2$ protein is associated with increased cell migration, but the functional implications of the release and intracellular accumulation of laminin $\gamma 2$ chain are not yet understood (80). (**Figure 6B**).

Overall, these experiments show that the regulation of laminin promoters by transcription factors is tissue-specific and developmentally regulated. It also confirms that the cancer cells are subjected to striking changes depending upon the microenvironment, and demonstrate that basement membrane molecules are potential targets of epithelial mesenchymal transition-associated transcriptional repressors.

V - Involvement of basement membrane proteins at the epithelial-mesenchymal interface in the intestine: use of gene ablation models

(a) Deletion of *lama5* induces multiple defects

Laminin-511 is the major laminin isoform at the epithelial-mesenchymal interface of numerous organs; it is present during development from the early somite stage, before becoming restricted to specific basement membranes later in development. Laminin $\alpha 5$ deletion leads to late embryonic lethality (E16-E17), and multiple tissue defects were observed in the *lama5* homozygote including exencephaly, digit septation, and dysmorphogenesis of the placental labyrinth, lung, kidney, and tooth development, as well as alterations in neural crest cell migration (81-85).

The hair defect: a characteristic example

Deletion of the *lama5* gene proved that it is important for various differentiation events at late embryonic stages, as exemplified for hair germ morphogenesis and differentiation, which are significantly altered in the mutant skin. A very conclusive experiment dealing with hair development was performed using E 16.5 wild-type and $\alpha 5$ -null skin grafted in nude mice up to P28; under these conditions, the mutant mice failed to develop hairs. Defects in the $\alpha 5$ -mutant skin are linked to the loss of Shh, of *gly1*, and of its target genes, demonstrating that laminin-511 is required for Shh-driven hair follicle morphogenesis (86), likely through binding to integrins because the loss of $\alpha 3$ or $\beta 1$ integrin leads to similar hair follicle defects (87;88). Additional experiments proved that incubation of E16.5 mutant skin in purified laminin-511 for five and nine days post-grafting was able to restore hair follicle formation in mutant grafts (86).

Defects associated with the absence of lama5 in the intestinal tissue

Of the laminin α chains, $\alpha 5$ displays the broadest distribution in the intestine. It is present in the subepithelial basement membrane throughout development, around smooth muscle cells with an increasing intensity paralleling differentiation, and in the basement membranes of large blood vessels (33). In our former study of the laminin $\alpha 5$ -deficient gut, it appeared that although no obvious changes were seen in the villus morphology, major alterations were found in the smooth muscle coat, as well as in the appearance of mucus epithelial cells. The most important defects were linked to excessive folding of intestinal loops with fusion of muscular layers and to the absence of the mesentery and the serosal layer. As soon as E14, the cytodifferentiation of the muscle cells was delayed as seen by the lower α -smooth muscle actin and desmin expression in the mutants compared to the wild type intestines; in parallel the number of proliferating mesenchymal cells was also decreased (89) (**Figure 7A**). In the skin, it was shown that *lama5* is required for hair follicle development and is involved the Shh pathway (86), and the regulation of the *lama5*-dependent intestinal development depends on both the Wnt and PI3K pathways (Ritie and Spenle et al. personal communication).

Rescue experiments in the intestine

Very informative rescue experiments have been carried out by Jeffrey Miner's laboratory (90). Because the laminin $\alpha 5$ -deficient mouse embryos die around E16-E17, Miner's team crossed the homozygous null mice with transgenic mice carrying a *lama5* cDNA driven by a chicken β -actin promoter (called the MR5 transgene) which completely rescued the developmental defects of the mice. The mice resulting from these crossings (KO/Tg) are both viable and fertile. Nevertheless, after birth, KO/Tg mice showed a progressive decrease of the *lama5* transgene deposits in the subepithelial BM; the transgene expression was finally lost after three months, through the length of the intestine. Dramatic changes occurred in the small intestinal architecture of the KO/Tg mice, where a shift was observed from normal distal intestinal villi to varying degrees of larger, coalescent, or cerebroid villus patterns mimicking the colon surface (**Figure 7B**). To overcome the lethality of the laminin- $\alpha 5$ deletion, Miner's group grafted embryonic small intestinal segments under the skin of nude mice. Here again, grafts derived from *lam* $\alpha 5$ -null small intestine presented a colon-like architecture instead of the typical crypt-villus morphology.

Compensation processes occur in both laminin $\alpha 5$ -null and in KO/Tg intestines

Interestingly, in the $\alpha 5$ -null developing intestines, laminin $\alpha 5$ chain deficiency leads to misexpression of other laminin α chains; in particular, the laminin $\alpha 2$ and $\alpha 4$ chains were

ectopically expressed at the epithelial/mesenchymal interface, which can be interpreted as a compensation process (89). In more advanced $\alpha 5$ -deprived intestines (using grafting experiments), laminin $\alpha 1$ chain was also found to be increased. Similarly, in the distal intestinal basement membrane of adult KO/Tg mice, the loss of the $\alpha 5$ transgene was compensated for by $\alpha 1$ and $\alpha 4$ chains (90). To determine whether the cellular origin of the ectopically expressed $\alpha 2$ - and $\alpha 4$ -laminins was epithelial or mesenchymal, we used our original reassociation experiments (89). This was performed by recombining $\alpha 5$ -mutant mouse mesenchyme with chick endoderm as well as chick mesenchyme with mouse laminin $\alpha 5$ mutant endoderm, and then grafting both types of recombinants in the coelomic cavity of chick embryos. These chimeric associations developed into intestinal structures presenting small villi and a muscle coat as well as subepithelial and muscle basement membranes. These experiments allowed us to confirm that there is a compensation for the lack of the $\alpha 5$ chain by both the $\alpha 2$ and $\alpha 4$ laminin chains. Interestingly, these chains, which are unusually found at the basement membrane level, are produced by the mesenchymal compartment (**Figure 3B**).

These experiments demonstrate that modifications in the expression patterns of the basement membrane molecules not only lead to changes in the intestinal architecture, but also to alterations of cellular and functional properties of both the epithelium in $\alpha 5$ -null and KO/Tg mice and the mesenchyme in the $\alpha 5$ -null mice (89;90). This is exemplified in the epithelium by (i) changes in the number and phenotype of mucus cells, (ii) a higher number of Paneth cells found above the crypt-villus junction, (iii) increased cell proliferation coupled with a dramatic decrease of the cell cycle inhibitor P27/Kip1, (iv) higher vertical migration along the crypt-villus axis, and (v) impaired absorption of dietary lipids. Finally, in the mesenchyme, the lack of laminin $\alpha 5$ chains leads to intestinal muscle defects.

(b) Deletion of the *lama1* gene

The laminin $\alpha 1$ chain is associated with the $\beta 1$ and $\gamma 1$ chains, which are shared by most of the laminins. During embryogenesis, the $\alpha 1$ chain first appears at the 16-cell stage and is later present in the two basement membranes formed before gastrulation, the embryonic basement membrane and the Reichert's membrane (91;92).

Three different models: similar conclusions

Using a gene trap insertion in the *lama1* gene that inactivates the $\alpha 1$ chain, it was shown that in the *lama1* null embryos the embryonic basement membrane forms, the embryonic ectoderm cavitates, and the parietal endoderm differentiates, probably due to partial compensation by the laminin $\alpha 5$ chain. A transgenic overexpression of laminin $\alpha 5$ (MR5) improved the defects of *lama1*-deficient embryos, but did not rescue the Reichert's membrane leading to embryonic lethality at E6.5/7.5, indicating that the laminin α chains are not interchangeable (92). A second interesting model involves the generation of mice lacking the cell binding domain of laminin $\alpha 1$ called LG 4-5 (93), known to bind dystroglycan and syndecan (28). These embryos incorporated truncated laminin $\alpha 1$ chains into basement membranes, but development of epithelial sheets of post-implantation embryos did not occur; at E5.5, parietal endoderm cells and an inner cell mass of stem cells could be distinguished, and embryos died at E6.5 prior to gastrulation (93). In parallel, Olivier Lefebvre developed a mouse carrying a conditional mutation of the *lama1* gene (94) which should allow for further exploration of the function of laminin $\alpha 1$ in a given tissue and address the early lethality linked to the deletion of laminin $\alpha 1$ during the pre-implantation stages. The generation of a floxed *lama1* mouse line crossed with a line carrying the Cre recombinase under the control of the CMV promoter validated this model. In these conditions, the early deletion of the *lama1* in mice leads to a defect in the Reichert's membrane at the interface between the

placenta and the developing embryo. Here again, the absence of $\alpha 1$ chains led to early embryonic lethality (between E6.5 and 7.5) immediately prior to gastrulation. In the absence of the laminin $\alpha 1$ chains, the various basement membrane molecules (collagen IV, nidogen, perlecan) are not deposited in the Reichert's membrane, which shows that laminin-111 is essential for the assembly and organization of a complete structured basement membrane (94). Unfortunately, the fact that the embryos do not develop beyond E6.5 prevents the study of its role in later developmental stages.

Overcoming early lethality

A viable *lama1* null mutant has been generated for the first time by Olivier Lefebvre and Fabien Alpy (95). The *lama1*^{flxed} mice have been crossed with transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the Sox-2 promoter. Sox2 is expressed in the embryonic epiblast, from which embryonic structures are derived. Sox2 is not expressed in the extraembryonic annexes, leaving the Reichert's membrane intact and allowing the development of organs devoid of laminin $\alpha 1$ (96). Despite the fact that *lama1* is expressed in numerous organs, these *lama1* ^{$\Delta\Delta$} /Sox2-Cre mice are viable, fertile, and lactate normally. A genomic analysis of various organs confirmed the exclusive presence of the deleted allele, and thus the total gene ablation of the *lama1* gene. These observations suggest important compensatory mechanisms that allow laminin $\alpha 1$ chains to be replaced by other laminins.

In parallel, a *lama1* ^{$\Delta\Delta$} /villin-Cre mouse line has been generated in order to analyze the possible involvement of the laminin $\alpha 1$ chain in the intestine. None of the developmental, histological, or functional parameters analyzed so far seem to be affected. Further analysis needs to be performed in various experimental models of induced pathologies of the digestive tract.

The retinal phenotype

In some specific basement membranes, the laminin $\alpha 1$ chain is not compensated by other laminin α chains. This is the case in the retina of *lama1* ^{$\Delta\Delta$} /Sox2-Cre mice, in which alterations occur, including (i) the absence of $\alpha 1$ chain accompanied by the lack of the basement membrane at the level of the inner limiting membrane, leading to a reduced number of ganglionic cells and to a disorganization of the glial cells (Müller cells), and (ii) the abnormality of the retinal vascular system, demonstrated by optomotor tests and electroretinograms showing that the mice lacking the laminin $\alpha 1$ chain are blind (95). Moreover, creation of a mouse strain carrying a point mutation in the LN domain of the *lama1* gene, led to a similar, but less severe, retinal phenotype. These data suggest that some human eye diseases could be due to a *LAMA1* defect. (95). In conclusion, the various gene ablation models described above concerning either laminin $\alpha 5$ chain or laminin $\alpha 1$ chain emphasize the importance of these molecules in the human and animal kingdom, because most organs in the body are protected by compensatory mechanisms.

(c) Deletion of the lama2, lama3 and lama4 genes

The laminin $\alpha 2$ chain is found in the intestinal basement membrane at the bottom of the crypts as soon as the crypts are formed. Its mesenchymal origin has been demonstrated by inter-species epithelial/mesenchymal recombination experiments (33). This laminin isoform is likely secreted by the myofibroblasts that lie under the crypts (47;97) As the expression of laminin $\alpha 2$ coincides with the formation of the crypts, it is prudent to investigate whether this laminin could play a role in their genesis, or in the confinement of stem cells or Paneth cells in the crypt region. However, the *dy/dy* spontaneous mutant mice, which display severe muscular dystrophy (98), did not show any perturbation of the intestinal crypt formation,

despite the lack of laminin $\alpha 2$ in the crypt bottom. Thus, the lack of the laminin $\alpha 2$ chain did not interfere with the crypt morphogenesis nor with the Paneth cell cytodifferentiation (97). No other intestinal defects have been linked to the absence of this laminin isoform.

The laminin $\alpha 3$ chain is primarily associated with $\beta 3/\gamma 2$ chains forming laminin-332. Its targeted disruption in mice leads to a severe phenotype in which skin blisters form (linked to the absence of hemidesmosome components) shortly after birth (99). The absence of the $\alpha 3$ chain characterizes one of the epidermolysis bullosa phenotypes (100;101). Gastrointestinal failure was described in *lama3*-null mice, as the stomach displayed a reduction of both size and milk content (99). Interestingly, a few papers describe human gastrointestinal complications that may be linked to a mutation in one of the genes encoding polypeptides of laminin-332 or one of the $\alpha 6$ or $\beta 4$ integrin genes (100).

The laminin $\alpha 4$ chain (a component of the laminin-411) is expressed in endothelial basement membranes of various organs, including the intestine, as well as around developing muscle fibers (33;102). Laminin $\alpha 4$ -null mice hemorrhaged during development and bled excessively (103). No intestinal phenotype has been described so far, although this chain is predominant in the intestinal muscle coat.

VI- Genetic inactivation of laminin receptors leads to intestinal abnormalities

The effects of basement membrane on cellular behavior are mediated by several types of receptors, including primarily integrins, but also dystroglycan, syndecans, and Lutheran blood group glycoprotein (28). Although gene ablation animal models have provided essential information about integrin function in several organs (104), receptor functions and downstream signaling in the intestine remain to be clarified. Only sporadic data (detailed herein) are available regarding the intestinal tissue that show that $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins, as well as Lutheran, are involved in intestinal morphogenesis.

Conditional deletion of *$\beta 1$ integrins* in the intestinal epithelium using the villin promoter leads to postnatal lethality due to severe malnutrition (105). However, no changes occur in epithelial adhesion, survival and basement membrane formation, which suggests that other adhesion molecules are responsible for these processes. Surprisingly, defect in $\beta 1$ integrins causes a strong increase in epithelial proliferation (crypt hyperplasia, ectopic epithelial proliferation) concomitant to increased and mislocated expression of Tcf-4. On the other hand, a loss of Sonic and Indian Hedgehog is obvious in the mutants, indicating that Hedgehog (Hh) expression is dependent on $\beta 1$ integrin expression. Because gut epithelial cells do not express Hh receptors, the authors postulate that Hh acts on the surrounding stromal cells (which may explain the stromal expansion in the mutants) which could be indirectly responsible for the down-regulation of cell proliferation. These data suggest that the principal function of the $\beta 1$ integrins in the intestinal tissue is not cell anchorage but rather extracellular matrix-induced regulation of epithelial proliferation.

The *$\alpha 6\beta 4$ integrin* is expressed in many stratified epithelial cells, where it is linked to hemidesmosomes. In the monostratified epithelium of the intestine, this integrin is located in type II hemidesmosomes lacking some components such BP230 and BP180 (70). Two integrin $\beta 4$ -deficient mice were generated, which led to conflicting observations in the intestinal epithelium of homozygous mutant mice. In one case, no intestinal phenotype was described (106), whereas the second group observed an important detachment of the crypt-villus epithelial layer from the underlying mesenchyme (107). Absence of $\beta 4$ integrin in mice carrying a targeted deletion of the $\beta 4$ cytoplasmic domain, however, led to a significant proliferative effect (108). Indeed, the precursor cells that remain adhered to the basement membrane and post-mitotic enterocytes display increased levels of the cyclin-dependent

kinase inhibitor p27^{Kip}. The level of expression and localization of lactase were unchanged, suggesting that $\alpha 6\beta 4$ signaling is not required for normal differentiation of the intestine, but is necessary for cell cycle control. In contrast to the relatively mild intestinal defects, deletion of the $\beta 4$ subunit in the epidermis led to a junctional epidermolysis bullosa phenotype; the mice died soon after birth from this severe defect.

The *Lutheran/BCAM* adhesion glycoprotein was first identified as laminin-511/521 erythroid receptor and is involved in red blood cells adhesion. Localization of the Lutheran receptor at the basal surface of epithelial cells and on muscle cells adjacent to basement membrane suggests that it can function as a (co)receptor for $\alpha 5$ -chain-containing laminins in mice (109). Lutheran-null mice were generated; they were healthy and developed normally (110). Analysis of the intestine showed that the lack of Lutheran was associated with a thickening of the smooth muscle layers (which express mainly laminin-521), accompanied by the impaired organization of the myofilaments, and a disorganization of the smooth muscle basement membrane. Surprisingly, these defects did not lead to changes in the intestinal transit. Despite the presence of Lutheran at the base of epithelial cells, their normal program of differentiation was not compromised in the intestines of mutant mice, suggesting that integrins are presumably the major epithelial laminin $\alpha 5$ chain receptors.

Conclusion and future directions

Dynamic reciprocity between endoderm and mesenchyme components during intestinal development allows tissue morphogenesis and differentiation. Using various recombination/grafting experiments, it has been demonstrated that the interactions of cells and their surrounding microenvironment determines the pattern of gene expression (for review see (111)). We show that the epithelial/mesenchymal entity comprises a third dynamic component -that of the basement membrane-, composed of laminins and other basement membrane molecules required for the onset of tissue architecture and function during development as well as in mature organs. This integrated system depends on the expression of the relevant integrins which activate signaling pathways, leading to proliferation or differentiation of the epithelial and mesenchymal cells. Soluble paracrine factors, as well as systemic hormones, are also implicated in the direction of these integrated signals, which culminate with gene expression in the nucleus. Crosstalk between laminin-111 and the intestine transcription factor Cdx2 provides a good example of this process. Although the laminins are trimeric molecules, here we mainly focused on laminin α chains, which are the important functional chains, as they carry most of the receptor binding sites. The laminin α chains are not tissue-specific but they exhibit a huge panel of tissue- and development-restricted expression among the body organs. The gene ablation experiments demonstrate that laminin α chains are of critical importance in early embryonic stages (implantation of the embryos) as well as at later stages when important developmental defects can be seen in various organs despite some compensatory events.

Future directions

Whether transcription factors other than Cdx2 could be part of an integrated system specific to the digestive tract –including basement membrane molecules, basement membrane receptors, signaling pathways, and tissue-specific gene expression– remains to be explored. Choi and colleagues (112) documented a transcription factor gene expression survey of the developing mouse digestive tract. Among those listed, *Isx* is a novel gene expressed selectively in the gut epithelium. *Isx* or some of the thousand other genes common to the stomach and gut could be used to help elucidate the functions governed by the basement membrane.

The microenvironment of the stem cell niche is still not clearly defined. Are there specific matrix molecules or basement membrane receptors that favor the confinement of the stem cells in the crypts? Are they common to the colon stem cell niche? What are the major changes in the microenvironment of the colon stem cells that facilitate tumor emergence? And finally what are the signaling pathways emanating from the basement membrane molecules to the stem cells? Demonstration of the fact that single-sorted LGR5-expressing stem cells are able to initiate crypt-villus organoids has been published by the Clevers laboratory (113). LGR5-expressing cells have been cultured in Matrigel containing laminins together with growth factors. Would stem cells be able to express and secrete laminins, and/or other basement membrane molecules in the absence of Matrigel or mesenchyme?

In this review, we excluded, with a few exceptions, pathological situations and in particular the tumor and invasion events in which the crosstalk between epithelial cells and stromal cells differs from that of the developing or mature digestive tract. In a tumoral context, at least laminin-111 and laminin-332 are potential targets of tumorigenesis. Transgenic animal models overexpressing laminin, triggered by azoxymethane or crossed with APC models, are interesting highly-angiogenic cancer models that may prove useful for testing blocking drugs or peptides in tumors. Likewise, proteolytic fragments of the extracellular matrix molecules secreted in the circulation are potential targets of therapeutic approaches (114).

Acknowledgements: The authors sincerely thank Leonor Mathern for the preparation of the figures, Christiane Arnold and Annick Klein for their skillful technical assistance, and Michele and Pierre Lavogez for the animal care. We gratefully acknowledge Zhen Mahoney and Jeffrey H. Miner (Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA) who provided us the scanning and electron microscopy figures of the rescued $\alpha 5$ KO/Tg mice. C. Spenle is a recipient of a fellowship of the French Ministry of Research and Education, and of the Ligue Contre le Cancer. The author's recent work has been supported by grants from the INCa (Institut National contre le Cancer) (PSA), Association pour la Recherche sur le Cancer (PSA), Hospital Interface Contract (MK). The Inserm Unit 682 is granted by the Inserm.

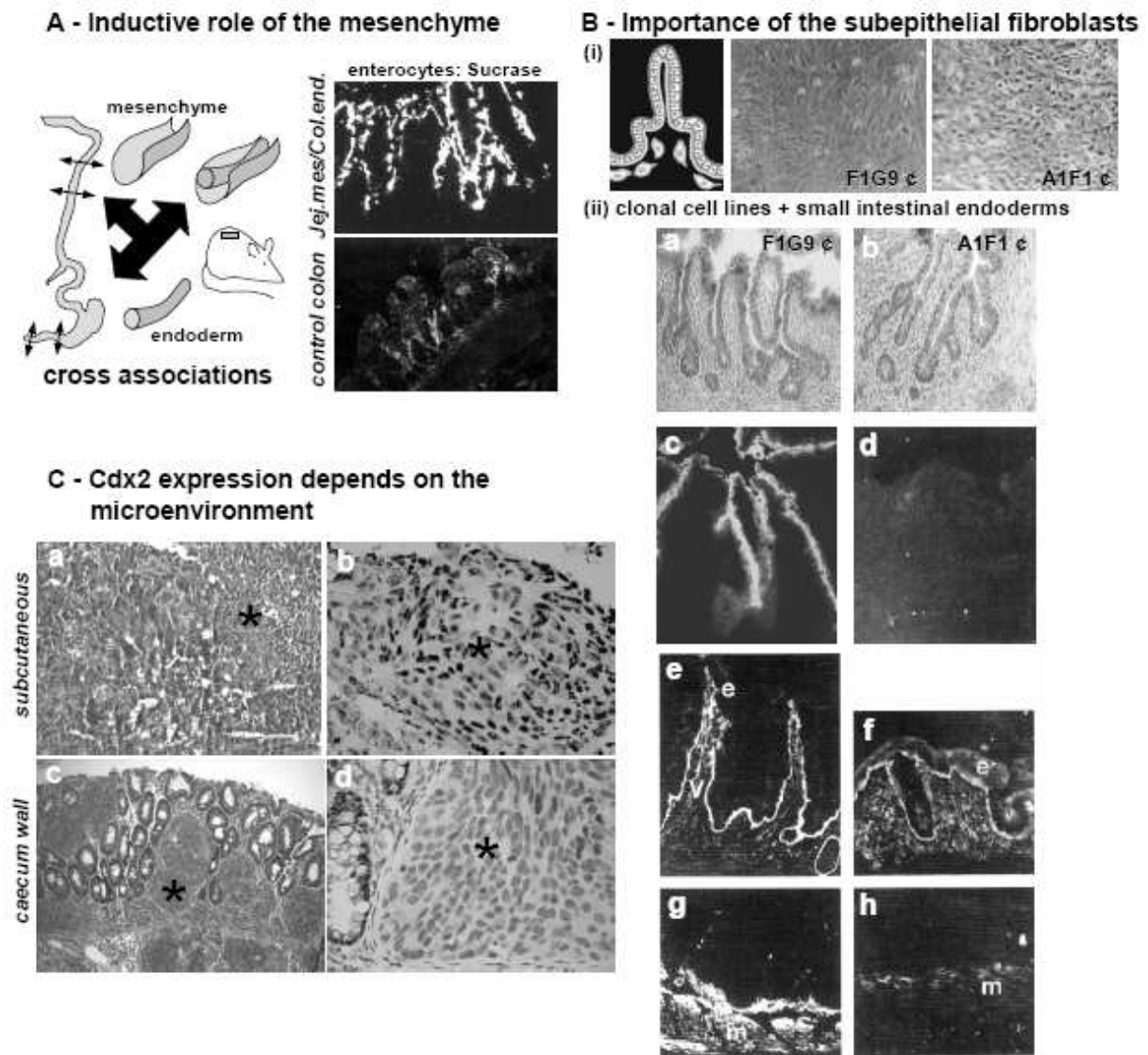


Figure 1: Models of epithelial-mesenchymal cross associations and importance of the stromal microenvironment

A: Inductive role of the small intestinal mesenchyme on the cytodifferentiation of the colon.

The jejunal mesenchyme (Jej.mes.) induces sucrase-isomaltase expression in the associated colon endoderm (Col.end.) after grafting under the skin of nude mice. The grafted control colon did not express sucrase-isomaltase (10).

B: Morphogenesis and differentiation depend on the stromal microenvironment.

(i) Post-natal intestinal subepithelial fibroblasts and two derived clonal cell lines F1G9 and A1F1, (ii) Associations of F1G9 or A1F1 cells with small intestinal endoderm showing respectively histology (a,b), lactase (c,d), basement membrane (e,f), and smooth muscle actin staining (g,h). This experiment shows that two clonal cell lines of subepithelial fibroblasts induce drastically different morphogenetic and differentiation patterns. e: epithelium; m: muscle coat (43).

C: The stromal microenvironment is instrumental for the maintenance of Cdx2 expression.

The colonic cancer cells T84 express high levels of Cdx2 in culture. When grafted subcutaneously, Cdx2 is still expressed whereas Cdx2 is downregulated when implanted in the caecum wall (24). *: point to tumoral cells.

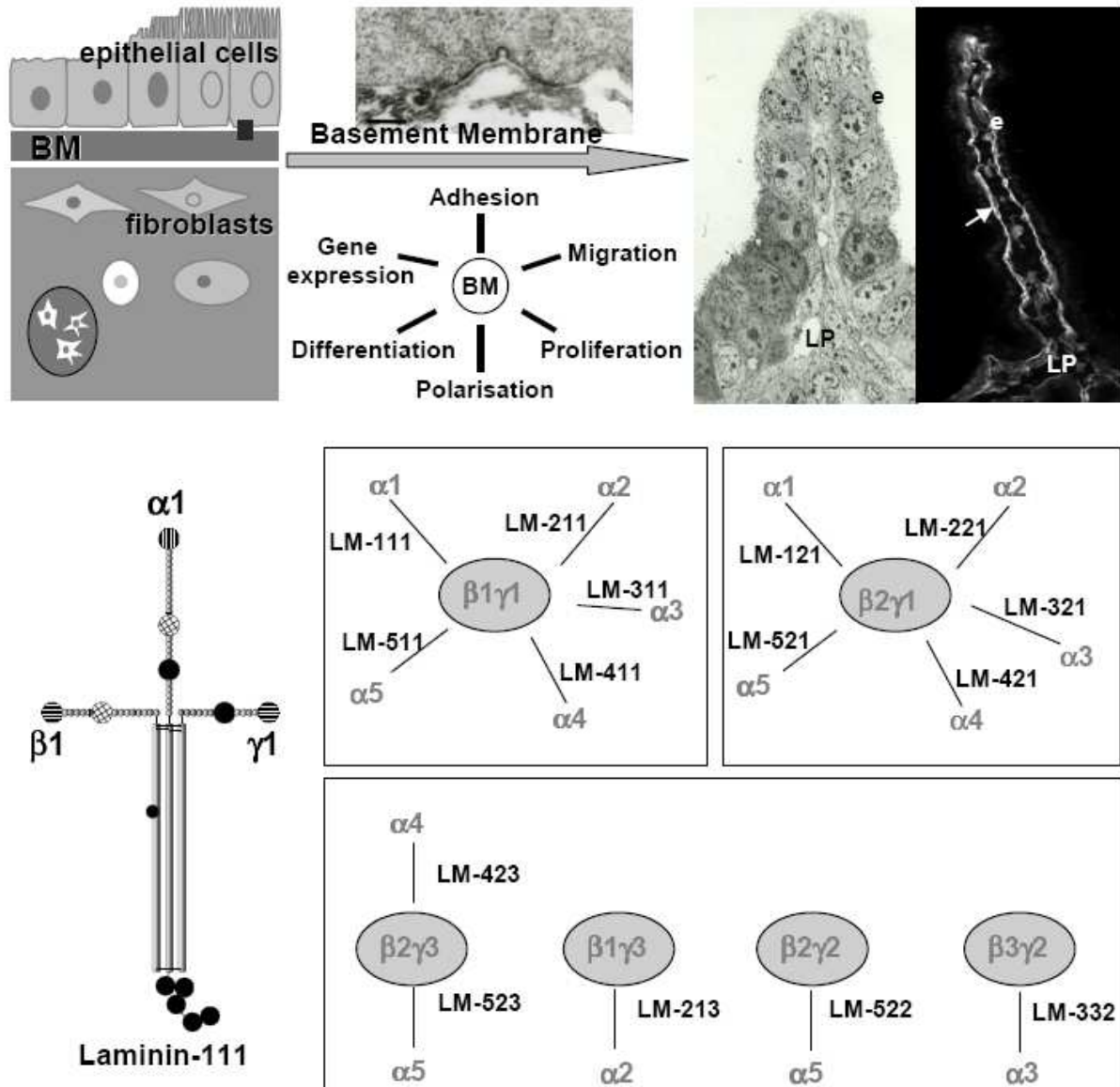


Figure 2: The subepithelial basement membrane in the mature adult intestine

In the adult intestine, the basement membrane is located at the interface between epithelial cells (e) and the underlying connective tissue (called lamina propria: LP) where fibroblasts, immune and smooth muscle cells are located. The electron-dense extracellular material (BM) can be visualized at the electron microscopy level or by immunostaining using specific antibodies such as pan-laminin antibodies along the crypt-villus axis in the adult intestine (arrow). The basement membrane is implicated in various cell and tissue functions such as adhesion, migration, proliferation, polarization/differentiation and gene expression. Laminins, major contributors of basement membrane, are heterotrimers consisting of a α , β and γ subunit. Laminin-111, a typical laminin prototype ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$), is depicted. The 15 distinct laminin (LM) isoforms are named according to their chain composition and here classified as a function of the $\beta\gamma$ dimer composition.

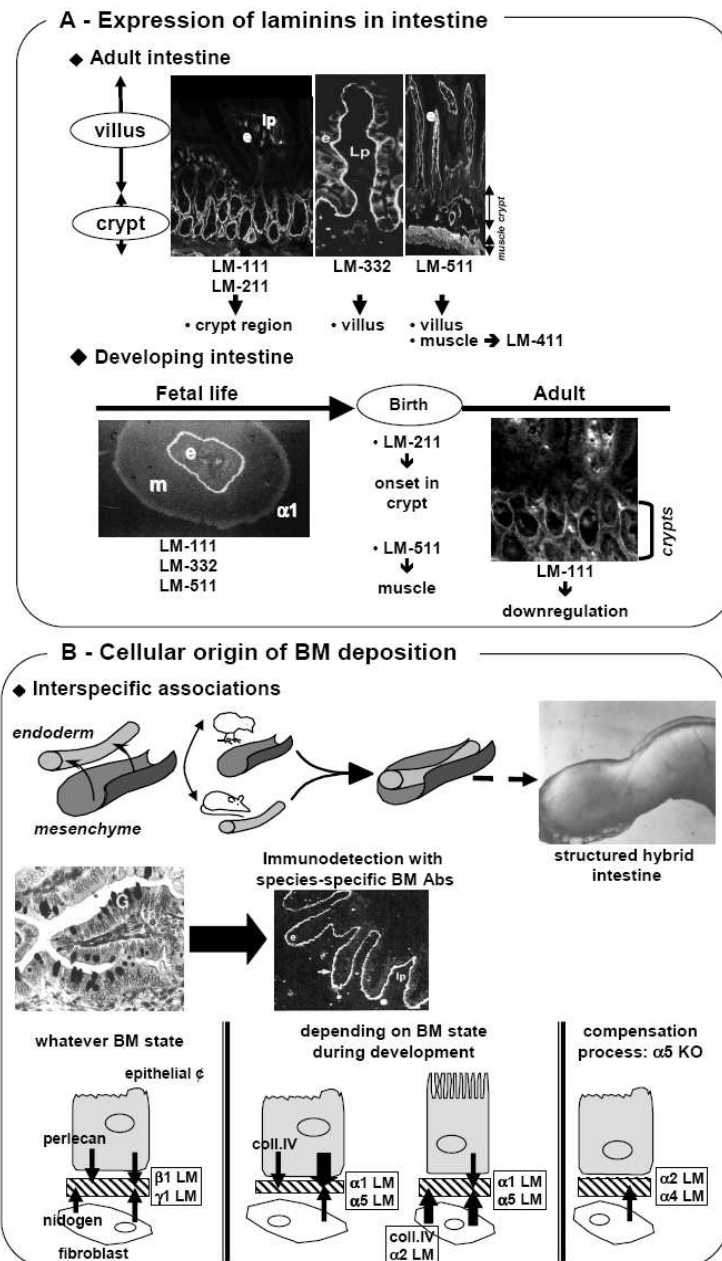
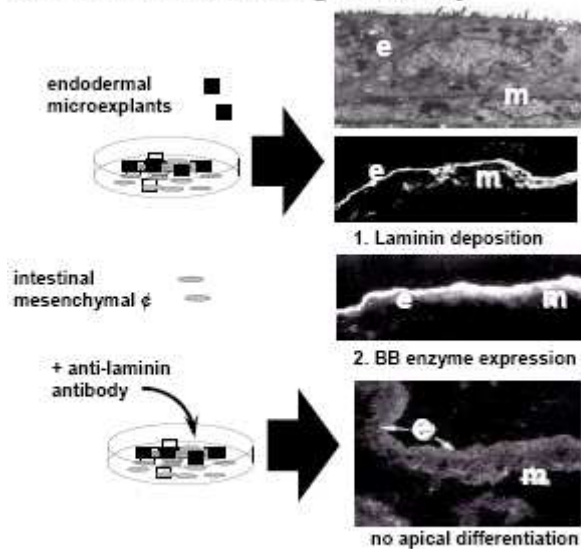


Figure 3: Expression of subepithelial laminins in the mature and developing intestine and cellular origin of basement membrane molecules

A: Distribution of the putative laminin (LM) isoforms expressed in the adult small intestine along the crypt-villus axis by immunodetection. Note the complementary locations of laminin-111/-211 restricted to the crypt region and of laminin-332/-511 along the villus at the subepithelial basement membrane region. During intestinal development, the various laminin isoforms are expressed sequentially: during fetal life, laminin-111, -332 and -511 are expressed at the endodermal/mesenchymal junction; at birth, laminin-211 and -511 are deposited respectively in the crypt region when formed and in the muscle coat; finally in adult intestine, a clear downregulation of laminin-111 occurs as assessed by the strict location of $\alpha 1$ chain at the crypt region. e: epithelial cells; m: mesenchymal cells; lp: lamina propria.

B: In order to define the cellular source of the molecules deposited at the subepithelial basement membrane, hybrid intestines between chick and rodent tissue anlagen (endoderm/mesenchyme) were performed and grafted. Application of species-specific antibodies against basement membrane molecules on sections from developed hybrid intestines allowed us to define the cellular origin of basement membrane production/deposition. As an example, immunodetection of laminin $\gamma 1/\beta 1$ chains with anti-mouse antibodies on chick mesenchyme/mouse endoderm led us to conclude to their epithelia origin. The data compiled from various publications (115) and (33;36;37) point to cooperation between epithelial and mesenchymal cells for basement membrane deposition according the developmental stage and to possible mesenchymal compensation mechanisms as shown in the *lama5^{-/-}* intestine.

A - Laminin blocking antibody



B - Laminin $\alpha 1$ anti-sense strategy

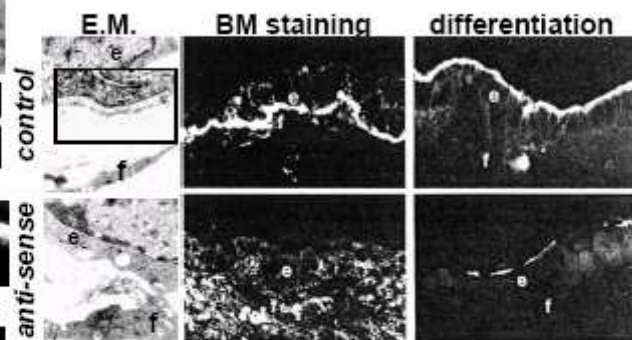


Figure 4: The basement membrane at the epithelial-mesenchymal interface is crucial for the differentiation of epithelial cells

A: Cocultures of 14 day-old endodermal microexplants (e) seeded on top of mesenchymal cells (m) form a continuous basement membrane (laminin staining) at the epithelial/ mesenchymal cell interface. This first step allows an apical expression of brush border enzymes, which is not possible in the presence of anti-laminin antibody (36).

B: Demonstration in co-cultures of CaCo2 cells (e) and intestinal fibroblasts (f) of the implication of the laminin $\alpha 1$ chain in the organization of the basement membrane at the electron microscopy level (EM) or basement membrane (BM) staining, and subsequently of epithelial differentiation, using an laminin $\alpha 1$ antisense strategy (55).

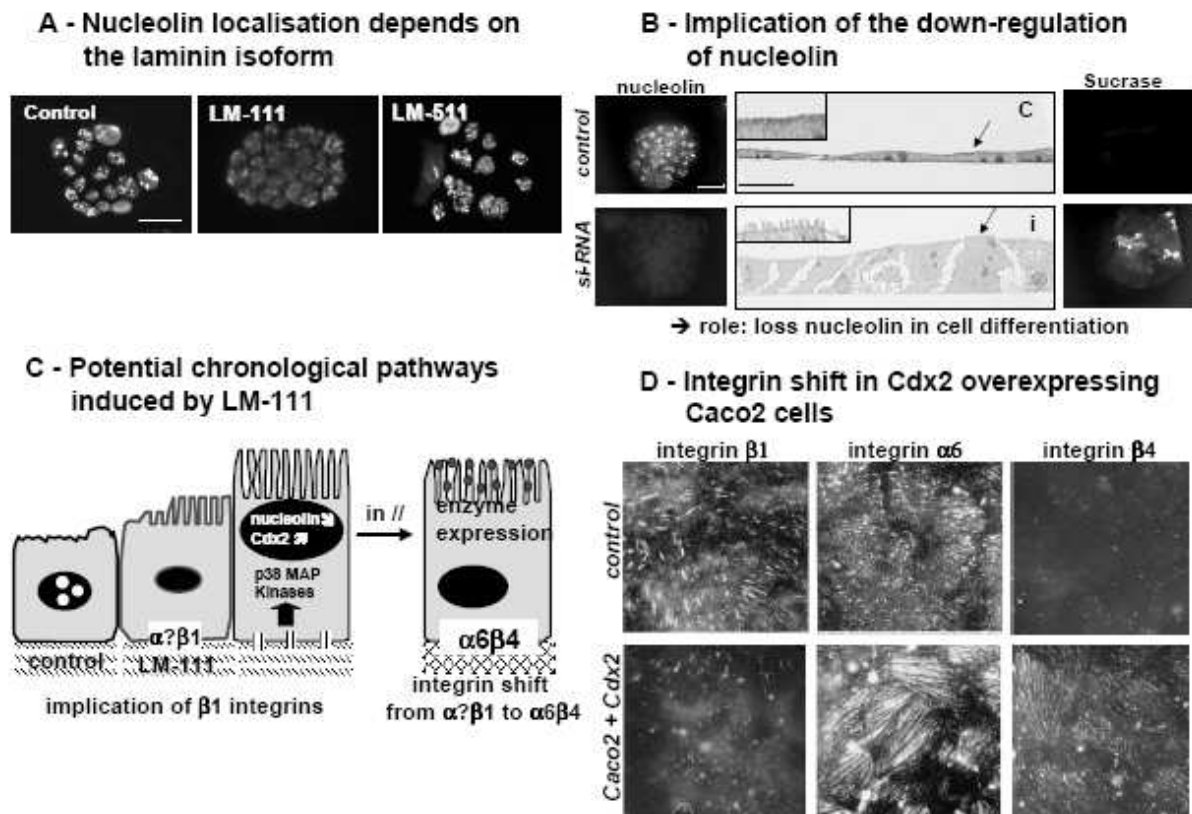


Figure 5: Potential chronological pathways of epithelial cell differentiation induced by laminin-111: interplay between laminin-111 and Cdx2

A: Subcellular localization of nucleolin in Caco2 cells is depending on the substratum. **B:** Implication of the downregulation of nucleolin (siRNA) on cell differentiation. **C:** Signaling pathways involving respectively laminin-111, nucleolin, Cdx2 and integrins in Caco2 cell differentiation. **D:** integrin shift in cells seeded on laminin-111 or in cells overexpressing Cdx2 (52;53;56).

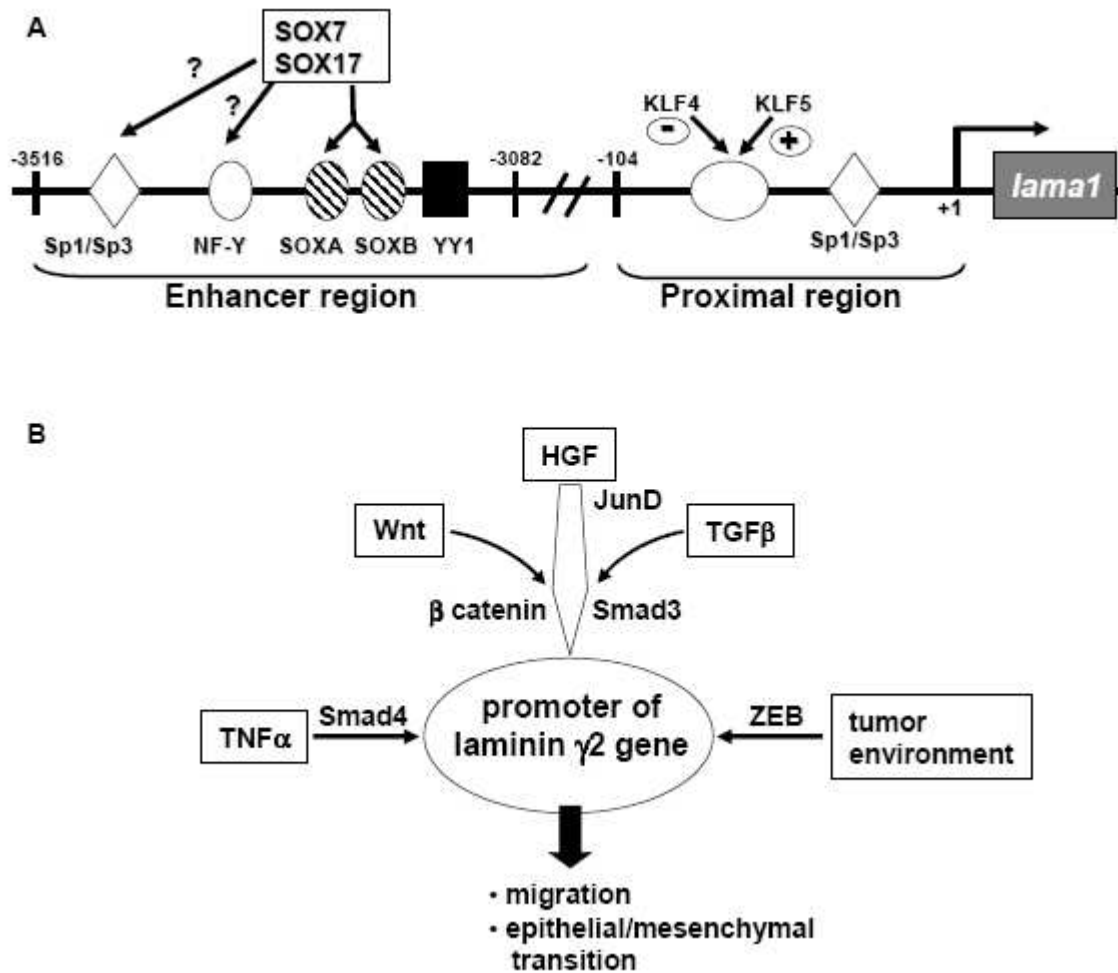
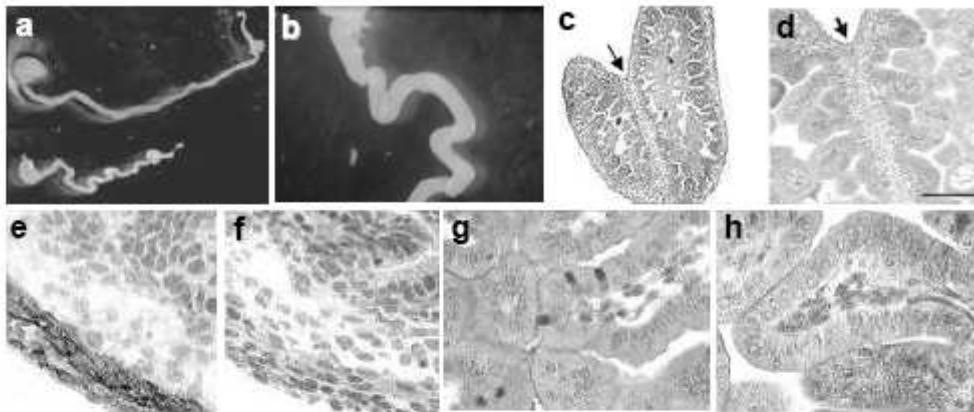


Figure 6: Regulation of the *lama1* and *lamc2/LAMC2* gene promoters

A: The upstream enhancer region (- 3516/-3082) of the murine *lama1* contains multiple transcription factor-binding sites which are targets for Sox7 and Sox17 that act in synergy with NF-Y and Sp1/SP3 transcription factors (65). In the proximal region, an Sp1-binding GC box and a Krüppel-like element was shown to be important for the promoter activity; two Krüppel-like factors (KLF4 and KLF5) exhibit opposing effects; negative and positive action, respectively (61).

B: Regulation of the promoter region of the laminin γ 2 gene by various cytokines or growth factors, by the Wnt signaling pathway, and the tumor microenvironment and their known transcriptional mediators leading to migration or epithelial/mesenchymal transitions (for references see section IV).

A - Invalidation of *lama5*



B - Rescue experiments

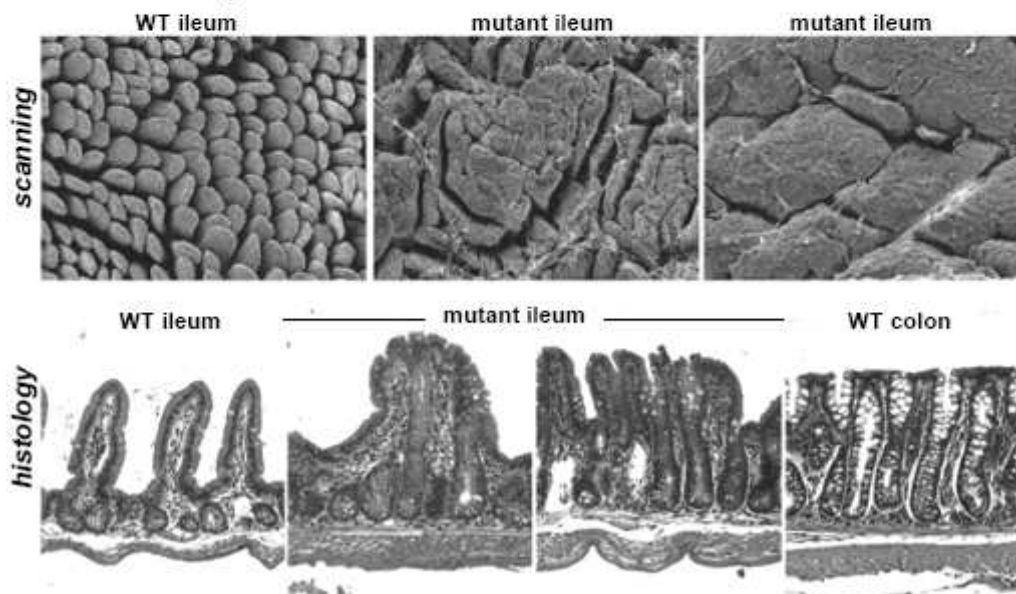


Figure 7: Laminin $\alpha 5$ chain is required for the establishment and maintenance of the small intestinal epithelium and muscular homeostasis

A: Germinal gene ablation of the *lama5* gene leads to important defects in both the epithelial and mesenchymal tissues. (a, b) The laminin $\alpha 5^{-/-}$ intestines are smaller than the controls and display loop fusions. (c, d) Sections of the $\alpha 5^{-/-}$ embryonic intestines show fusion of the muscular layers (arrows). (e, f) In parallel, desmin expression is severely reduced in the $\alpha 5^{-/-}$ muscular layers. (g, h) The number of mucus cells in the mutant mice is strikingly reduced compared to the control (89). It is worth noting that Wnt and PI3Kinase/Akt pathways are altered in the mutant mice intestines. (Ritie and Spenle et al. personal data).

B- Rescue experiments in the *lama5* null mice point to the major role of laminin-511 in the intestinal morphogenetic and functional homeostasis. In $\alpha 5$ mutant mice crossed with transgenic *lama5* mice, striking morphological changes occurred, primarily in the ileum. Scanning electron microscopy, as well as histological sections, clearly show a shift from normal villi structures in the wild type (WT) ileum to major villi alterations in the mutants characterized by villus fusions and cerebroid organizations which finally present a colon-like architecture (90). We sincerely acknowledge Zhen Mahoney and Jeffrey H. Miner (Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri, USA) who provided us the scanning and electron microscopy figures of the rescued $\alpha 5$ KO/Tg mice.

Reference List

1. Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C., and Li, L. (2008). Current view: Intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* **134**, 849-864.
2. Yasugi, S. and Mizuno, T. (2008). Molecular analysis of endoderm regionalization. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**, S79-S96.
3. Brabletz, S., Schmalhofer, O., and Brabletz, T. (2009). Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J. Pathol.* **217**, 307-317.
4. McLin, V. A., Henning, S. J., and Jamrich, M. (2009). The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **136**, 2074-2091.
5. van der Flier, L. G. and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology* **71**, 241-260.
6. Le Douarin, N. and Bussonnet, C. (1966). Early determination and inductive role of the pharyngeal endoderm in the chick embryo. *C. R. Acad. Sci. Paris* **263**, 1241-1243.
7. Gumpel-Pinot, M., Yasugi, S., and Mizuno, T. (1978). Differentiation of the endodermal epithelium associated with the splanchnic mesoderm. *C. R. Acad. Sci. Paris* **286**, 117-120.
8. Haffen, K., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1987). Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* **6**, 14-23.
9. Haffen, K., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1989). Cell contact dependent regulation of enterocytic differentiation. In "Human Gastrointestinal Development" (Lebenthal, E., Ed.), pp. 19-39, Raven Press, New York.
10. 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.
11. Quaroni, A., Wands, J., Tresltad, R. L., and Isselbacher, K. J. (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell Biol.* **80**, 248-265.
12. Kedinger, M., Lacroix, B., Marxer, A., Hauri, H. P., and Haffen, K. (1986). Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endoderm and crypt cells. *Dev. Biol.* **113**, 474-483.
13. Kedinger, M., Simon-Assmann, P., Grenier, J. F., and Haffen, K. (1981). Role of epithelial-mesenchymal interactions in the ontogenesis of intestinal brush-border enzymes. *Dev. Biol.* **86**, 339-347.
14. Haffen, K., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Lacroix, B. (1982). Mesenchyme-dependent differentiation of intestinal brush-border enzymes in the gizzard endoderm of the chick embryo., pp. 261-270, A.R. Liss, Inc, New York.
15. Duluc, I., Freund, J. N., Leberquier, C., and Kedinger, M. (1994). Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J. Cell Biol.* **126**, 211-221.
16. de Santa Barbara, P., Williams, J., Goldstein, A. M., Doyle, A. M., Nielsen, C., Winfield, S., Faure, S., and Roberts, D. J. (2005). Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Dev. Dyn.* **234**, 312-322.
17. Kim, B. M., Buchner, G., Miletich, I., Sharpe, P. T., and Shivdasani, R. A. (2005). The stomach mesenchymal transcription factor *Barx1* specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling. *Dev. Cell* **8**, 611-622.

18. Subramanian, V., Meyer, B. I., and Gruss, P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**, 641-653.
19. Bonhomme, C., Calon, A., Martin, E., Robine, S., Neuville, A., Kedinger, M., Domon-Dell, C., Duluc, I., and Freund, J. N. (2008). *Cdx1*, a dispensable homeobox gene for gut development with limited effect in intestinal cancer. *Oncogene* **27**, 4497-4502.
20. Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* **386**, 84-87.
21. Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R. J., and Furness, J. B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in *Cdx2* mutant mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa* **96**, 7318-7323.
22. Tamai, Y., Nakajima, R., Ishikawa, T., Takaku, K., Seldin, M. F., and Taketo, M. M. (1999). Colonic hamartoma development by anomalous duplication in *Cdx2* knockout mice. *Cancer Res* **59**, 2965-2970.
23. Duluc, I., Lorentz, O., Fritsch, C., Leberquier, C., Kedinger, M., and Freund, J. N. (1997). Changing intestinal connective tissue interactions alters homeobox gene expression in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **110**, 1317-1324.
24. Benahmed, F., Gross, I., Guenot, D., Jehan, F., Martin, E., Domon-Dell, C., Brabletz, T., Kedinger, M., Freund, J. N., and Duluc, I. (2007). The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells. *Am J Pathol* **170**, 733-744.
25. Gao, N., White, P., and Kaestner, K. H. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by *Cdx2*. *Dev. Cell* **16**, 588-599.
26. Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B., and Jones, J. C. R. (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* **122**, 4409-4417.
27. Yurchenco, P. D. and Patton, B. L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des* **15**, 1277-1294.
28. Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* **339**, 259-268.
29. Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., 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., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y., and Yurchenco, P. D. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**, 326-332.
30. 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" (Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Zeitz, M., and Riecken, E. O., Eds.), pp. 46-64, New York.
31. 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" (Johnstone, P., Ed.), pp. 223-239, Kluwer Academic Publishers, London.
32. Teller, I. C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Menard, D., and Beaulieu, J. F. (2007). Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev. Dyn.* **236**, 1980-1990.
33. 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.

34. Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V., and Simo, P. (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**, 883-900.
35. Simon-Assmann, P., Bolcato-Bellemin, A.-L., Klein, A., and Kedinger, M. (2009). Tissue recombinants to study extracellular matrix targeting to basement membranes. *Methods Mol Biol* **522**, 309-318.
36. Simo, P., Bouziges, F., Lissitzky, J. C., Sorokin, L., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1992). Dual and asynchronous deposition of laminin chains at the epithelial-mesenchymal interface in the gut. *Gastroenterology* **102**, 1835-1845.
37. Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Vigny, M., and Kedinger, M. (1989). Origin and deposition of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in the developing intestine. *J. Cell Biol.* **109**, 1837-1848.
38. Martin, G. R. and Henning, S. J. (1982). Relative importance of corticosterone and thyroxine in the postnatal development of sucrase and maltase in rat small intestine. *Endocrinology* **111**, 912-918.
39. Henning, S. J. and Leeper, L. L. (1982). Coordinate loss of glycocorticoid responsiveness by intestinal enzymes during postnatal development. *Am. J. Physiol.* **242**, G89-G94.
40. Kedinger, M., Simon-Assmann, P., Alexandre, E., and Haffen, K. (1987). Importance of a fibroblastic support for in vitro differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. *Cell Differ.* **20**, 171-182.
41. Plateroti, M., Freund, J. N., Leberquier, C., and Kedinger, M. (1997). Mesenchyme-mediated effects of retinoic acid during rat intestinal development. *J. Cell Sci.* **110**, 1227-1238.
42. Kedinger, M., Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Arnold, C., Alexandre, E., and Haffen, K. (1990). Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with intestinal embryonic epithelium. *Differentiation* **43**, 87-97.
43. Fritsch, C., Simon-Assmann, P., Kedinger, M., and Evans, G. S. (1997). Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* **112**, 826-838.
44. Fritsch, C., Swietlicki, E. A., Lefebvre, O., Kedinger, M., Iordanov, H., Levin, M. S., and Rubin, D. C. (2002). Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J. Clin. Invest.* **110**, 1629-1641.
45. Seltana, A., Basora, N., and Beaulieu, J. F. (2010). Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound. Repair Regen.* **18**, 114-122.
46. Bouatrouss, Y., Herring-Gillam, F. E., Gosselin, J., Poisson, J., and Beaulieu, J. F. (2000). Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* **156**, 45-50.
47. Francoeur, C., Bouatrouss, Y., Seltana, A., Pinchuk, I. V., Vachon, P. H., Powell, D. W., Sawan, B., Seidman, E. G., and Beaulieu, J. F. (2009). Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **136**, 268-277.
48. Le Beyec, J., DELERS, F., Jourdan, F., Schreider, C., Chambaz, J., Cardot, P., and Pinçon-Raymond, M. (1997). A complete epithelial organization of Caco-2 cells induces I-FABP and potentializes apolipoprotein gene expression. *Experimental Cell Research* **236**, 311-320.
49. Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz, J., and Pinçon-Raymond, M. (2002). Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes. *J. Cell Sci.* **115**, 543-552.
50. Chartier, N. T., Laine, M., Gout, S., Pawlak, G., Marie, C. A., Matos, P., Block, M. R., and Jacquier-Sarlin, M. R. (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J. Cell Sci.* **119**, 31-46.

51. Turck, N., Richert, S., Gendry, P., Stutzmann, J., Kedinger, M., Leize, E., Simon-Assmann, P., Van Dorselaer, A., and Launay, J. F. (2004). Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells. *Proteomics* **4**, 93-105.
52. 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.
53. 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.
54. Li, S., Edgar, D., Fassler, R., Wadsworth, W., and Yurchenco, P. D. (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **4**, 613-624.
55. De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1996). Inhibition of laminin α 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J. Cell Biol.* **133**, 417-430.
56. Lorentz, O., Duluc, I., De Arcangelis, A., 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.
57. Brabletz, T., Spaderna, S., Kolb, J., Hlubek, F., Faller, G., Bruns, C. J., Jung, A., Nentwich, J., Duluc, I., Domon-Dell, C., Kirchner, T., and Freund, J. N. (2004). Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res* **64**, 6973-6977.
58. Aberdam, D., Virolle, T., and Simon-Assmann, P. (2000). Transcriptional regulation of laminin gene expression. *Microsc. Res Tech.* **51**, 228-237.
59. Virtanen, I., Gullberg, D., Rissanen, J., Kivilaakso, E., Kiviluoto, T., Laitinen, L. A., Lehto, V. P., and Ekblom, P. (2000). Laminin α 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp. Cell Res.* **257**, 298-309.
60. Yurchenco, P. D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y., and O'Rear, J. J. (1997). The α chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its β - and γ -chain partners. *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa* **94**, 10189-10194.
61. Piccinni, S. A., Bolcato-Bellemin, A.-L., Klein, A., Yang, V. W., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2004). Kruppel-like factors regulate the Lama1 gene encoding the Laminin alpha1 chain. *J. Biol. Chem.* **279**, 9103-9114.
62. Niimi, T., Hayashi, Y., Sekiguchi, K., and Kitagawa, Y. (2006). The Sp family of transcription factors regulates the human laminin alpha1 gene in JAR choriocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1759**, 573-579.
63. Shindo, T., Manabe, I., Fukushima, Y., Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto, S., Kawai-Kowase, K., Moriyama, N., Imai, Y., Kawakami, H., Nishimatsu, H., Ishikawa, T., Suzuki, T., Morita, H., Maemura, K., Sata, M., Hirata, Y., Komukai, M., Kagechika, H., Kadowaki, T., Kurabayashi, M., and Nagai, R. (2002). Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat. Med.* **8**, 856-863.
64. Niimi, T., Hayashi, Y., and Sekiguchi, K. (2003). Identification of an upstream enhancer in the mouse laminin alpha1 gene defining its high level of expression in parietal endoderm cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 9332-9338.
65. Niimi, T., Hayashi, Y., Futaki, S., and Sekiguchi, K. (2004). SOX7 and SOX17 regulate the parietal endoderm-specific enhancer activity of mouse laminin alpha1 gene. *J. Biol. Chem.* **279**, 38055-38061.

66. Katoh, M. (2002). Molecular cloning and characterization of human SOX17. *Int J Mol Med* **9**, 153-157.
67. 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.
68. Marinkovich, M. P. (2007). Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* **7**, 370-380.
69. Sugawara, K., Tsuruta, D., Ishii, M., Jones, J. C., and Kobayashi, H. (2008). Laminin-332 and -511 in skin. *Exp. Dermatol.* **17**, 473-480.
70. Orian-Rousseau, V., Aberdam, D., Fontao, L., Chevalier, L., Meneguzzi, G., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (1996). Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: Epithelial to mesenchymal shift for the laminin γ 2 chain subunit deposition. *Develop Dynam* **206**, 12-23.
71. 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.
72. Salo, S., Haakana, H., Kontusaari, S., Hujanen, E., Kallunki, T., and Tryggvason, K. (1999). Laminin-5 promotes adhesion and migration of epithelial cells: identification of a migration-related element in the γ 2 chain gene (LAMC2) with activity in transgenic mice. *Matrix Biol.* **18**, 197-210.
73. Hlubek, F., Jung, A., Kotzor, N., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2001). Expression of the invasion factor laminin γ 2 in colorectal carcinomas is regulated by β -catenin. *Cancer Res* **61**, 8089-8093.
74. Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., and Winton, D. J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* **18**, 1385-1390.
75. Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., and Brabletz, T. (2006). A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **131**, 830-840.
76. Zawel, L., Le Dai, J., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Kern, S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Molecular Cell* **1**, 611-617.
77. Olsen, J., Kirkeby, L. T., Brorsson, M. M., Dabelsteen, S., Troelsen, J. T., Bordoy, R., Fenger, K., Larsson, L. I., and Simon-Assmann, P. (2003). Converging signals synergistically activate the LAMC2 promoter and lead to accumulation of the laminin gamma 2 chain in human colon carcinoma cells. *Biochem J* **371**, 211-221.
78. Zapatka, M., Zboralski, D., Radacz, Y., Bockmann, M., Arnold, C., Schoneck, A., Hoppe, S., Tannapfel, A., Schmiegel, W., Simon-Assmann, P., and Schwarte-Waldhoff, I. (2007). Basement membrane component laminin-5 is a target of the tumor suppressor Smad4. *Oncogene* **26**, 1417-1427.
79. Zboralski, D., Bockmann, M., Zapatka, M., Hoppe, S., Schoneck, A., Hahn, S. A., Schmiegel, W., and Schwarte-Waldhoff, I. (2008). Divergent mechanisms underlie Smad4-mediated positive regulation of the three genes encoding the basement membrane component laminin-332 (laminin-5). *BMC. Cancer* **8**, 215.
80. Zboralski, D., Warscheid, B., Klein-Scory, S., Malas, M. B., Becker, H., Bockmann, M., Meyer, H. E., Schmiegel, W., Simon-Assmann, P., and Schwarte-Waldhoff, I. (2010). Uncoupled responses of Smad4-deficient cancer cells to TNF α result in secretion of monomeric laminin-gamma2. *Mol Cancer* **9**, 65.

81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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. (2003). Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *Embo J.* **22**, 2400-2410.
87. Brakebusch, C., Grose, R., Quondamatteo, F., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Pirro, A., Svensson, M., Herken, R., Sasaki, T., Timpl, R., Werner, S., and Fassler, R. (2000). Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on β 1 integrin expression on keratinocytes. *Embo J.* **19**, 3990-4003.
88. Conti, F. J. A., Rudling, R. J., Robson, A., and Hodivala-Dilke, K. M. (2003). alpha3beta1-integrin regulates hair follicle but not interfollicular morphogenesis in adult epidermis. *J. Cell Sci.* **116**, 2737-2747.
89. 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.
90. Mahoney, Z. X., Stappenbeck, T. S., and Miner, J. H. (2008). Laminin alpha5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J. Cell Sci.* **121**, 2493-2502.
91. Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R., and Wartiovaara, J. (1980). Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **76**, 100-114.
92. 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.
93. Scheele, S., Falk, M., Franzen, A., Ellin, F., Ferletta, M., Lonai, P., Andersson, B., Timpl, R., Forsberg, E., and Ekblom, P. (2005). Laminin alpha1 globular domains 4-5 induce fetal development but are not vital for embryonic basement membrane assembly. *PNAS* **102**, 1502-1506.
94. Alpy, F., Jivkov, I., Sorokin, L., Klein, A., Arnold, C., Huss, Y., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Lefebvre, O. (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis* **43**, 59-70.
95. Edwards, M. M., Mammadova-Bach, E., Alpy, F., Klein, A., Hicks, W. L., Roux, M., Simon-Assmann, P., Smith, R. S., Orend, G., Wu, J., Peachey, N. S., Naggert, J. K., Lefebvre, O., and Nishina, P. M. (2010). Mutations in Lamal1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 7697-7711.
96. Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L., and McMahon, A. P. (2002). Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mechanisms of Development* **119**, S97-S101.

97. 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. *Develop Dynam* **201**, 71-85.
98. Guo, L. T., Zhang, X. U., Kuang, W., Xu, H., Liu, L. A., Vilquin, J. T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Ruegg, M. A., Wewer, U. M., and Engvall, E. (2003). Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 207-215.
99. Ryan, M. C., Lee, K., Miyashita, Y., and Carter, W. G. (1999). Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **145**, 1309-1323.
100. Uitto, J. and Richard, G. (2004). Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet C. Semin. Med Genet* **131C**, 61-74.
101. Cristina, Has and Leena, Bruckner. Molecular and diagnostic aspects of genetic skin fragility. *J.Dermatol.Sci.* 44[3], 129-144. 1-12-2006.
102. Iivanainen, A., Korttesmaa, J., Sahlberg, C., Morita, T., Bergmann, U., Thesleff, I., and Tryggvason, K. (1997). Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain. *J. Biol. Chem.* **272**, 27862-27868.
103. Thyboll, J., Korttesmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol. Cell Biol* **22**, 1194-1202.
104. Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269-280.
105. Jones, R. G., Li, X., Gray, P. D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W. S., Madison, B. B., Gumucio, D. L., and Kuwada, S. K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J. Cell Biol.* **175**, 505-514.
106. Niessen, C. M., van der Raaij-Helmer, L. M. H., Hulsman, E. H. M., van der Neut, R., Jonkman, M. F., and Sonnenberg, A. (1996). Deficiency of the integrin $\beta 4$ subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: Consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci* **109**, 1695-1706.
107. Dowling, J., Yu, Q. C., and Fuchs, E. (1996). $\beta 4$ integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* **134**(2), 559-572.
108. Murgia, C., Blaikie, P., Kim, N., Dans, M., Petrie, H. T., and Giancotti, F. G. (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin $\beta 4$ cytoplasmic domain. *The EMBO J* **17**, 3940-3951.
109. 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.
110. Rahuel, C., Filipe, A., Ritie, L., El Nemer, W., Patey-Mariaud, N., Eladari, D., Cartron, J. P., Simon-Assmann, P., Le Van Kim, C., and Colin, Y. (2008). Genetic inactivation of the laminin alpha5 chain receptor Lu/BCAM leads to kidney and intestinal abnormalities in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F393-F406.
111. Nelson, C. M. and Bissell, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 287-309.
112. Choi, M. Y., Romer, A. I., Hu, M., Lepourcelet, M., Mechoor, A., Yesilaltay, A., Krieger, M., Gray, P. A., and Shivdasani, R. A. (2006). A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development* **133**, 4119-4129.

113. Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., and Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265.
114. Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-433.
115. Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Arnold, C., Haffen, K., and Kedinger, M. (1988). Epithelial-mesenchymal interactions in the production of basement membrane components in the gut. *Development* **102**, 339-347.

III. Revue 2 : Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis

(International Journal of Developmental Biology)

Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis

Patricia Simon-Assmann, Gertraud Orend, Elmina Mammadova-Bach, Caroline Spenlé and Olivier Lefebvre
INSERM, U682, 3 avenue Molière, Strasbourg, F-67200 and Université de Strasbourg, Strasbourg F-67081, France

Running title: Laminins in angiogenesis

Key words: laminin, basement membrane, vasculogenesis, angiogenesis, cancer

Abbreviations:

BM: Basement membrane
CAM: Chick chorioallantoic membrane assay
EC: Endothelial cells
ECM: Extracellular matrix
EHS: Engelbreth-Holm-Swarm
FGF: Fibroblast growth factor
FGFR: Fibroblast growth factor receptor
LM: Laminin
MMP: Matrix metalloproteinase
PDGF-(BB): Platelet-derived growth factor-(BB)
PDGF-R β : Platelet-derived growth factor receptor β
PTFE: polytetrafluoroethylene
TGF β : Transforming growth factor β
VE-cadherin: Vascular endothelial-cadherin
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

Corresponding author:

Patricia Simon-Assmann
INSERM, U682,
3 avenue Molière
67200 Strasbourg, France
e-mail address : Patricia.Simon-Assmann@inserm.fr
web page: <http://u682-inserm.u-strasbg.fr/>
telephone number : 33 (0)3 88 27 53 56
fax number : 33 (0)3 88 26 35 38

E-mail addresses of other authors

Gertraud Orend: Gertraud.Orend@inserm.fr
Elmina Mammadova-Bach: Elmina.Mammadova@inserm.fr
Caroline Spenlé: Caroline.Spenle@inserm.fr
Olivier Lefebvre: Olivier.Lefebvre@inserm.fr

Abstract

The interaction of endothelial cells and pericytes with their microenvironment, in particular with the basement membrane, plays a crucial role during vasculogenesis and angiogenesis. In this review we will focus on laminins, a major family of extracellular matrix molecules present in basement membranes. Laminins interact with cell surface receptors to trigger intracellular signalling that shape cell behaviour. Each laminin exhibits a distinct function on endothelial cells and pericytes which largely depends on the adhesion receptor profile expressed on the cell surface. Moreover, proteolytic cleavage of laminins may affect their role in angiogenesis. We will report *in vitro* and *in vivo* data on laminin-111, -411, -511 and -332 and their associated signalling that regulates cell behaviour and angiogenesis in normal and in pathological conditions. It will be summarized how tissue-specific deletion of laminin genes affects behaviour of endothelial cells and pericytes and thus angiogenesis. Moreover, it will be discussed how coculture systems with defined laminin expression contribute to our understanding of the roles of laminins in normal and pathological vasculogenesis and angiogenesis.

Introduction

The lumen of blood vessels is lined by endothelial cells (EC) that interact with a subendothelial basement membrane (BM) that is composed of a complex of several matrix proteins (**Figure 1**; Eble and Niland, 2009), and contains growth factors and proteases. The interaction of EC with this microenvironment, especially with the BM components, plays an essential role during angiogenic processes (Ingberg, 1992). During development, blood vessels are formed by two distinct processes described as vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis characterizes the generation of vessels from mesodermally derived angioblasts. Angiogenesis describes the formation of vessels through sprouting from a pre-existing plexus (Risau and Flamme, 1995). Both events involve cell migration, proliferation and extracellular matrix (ECM) remodelling. Angiogenesis is also an essential event in tumour growth and metastasis. Similar to physiological angiogenesis, tumour angiogenesis is regulated by BM molecules in particular upon break-down and reconstitution of the vascular BM during tumour progression. Cells within a tumour can promote angiogenesis, e.g. by secretion of soluble and insoluble angiogenic factors as well as by modulating protease activities. In addition to soluble factors such as growth factors and chemokines that can support or inhibit angiogenesis, matrix molecules of the BM also play a decisive role in angiogenesis. For example the interaction of EC with intact collagen IV promote angiogenesis whereas proteolytic fragments of collagen IV and other collagens counteract this process (for reviews Kalluri, 2003; Davis and Senger, 2005; Hallmann *et al.* 2005).

In this review we will focus on the role of LM in vasculogenesis and angiogenesis in normal tissue homeostasis and diseases. LM are multifunctional matrix molecules that are widely expressed forming the major scaffold of the BM (Yurchenco and Patton, 2009). LM display organ, site and developmental specificity (Miner and Yurchenco, 2004). They are crosslike-shaped trimers which are assembled into a triple-stranded coiled-coil structure. Up to 15 distinct isoforms have been described today and the functional differences of all LM is not well understood (Durbeej, 2010) (**Figure 1**). Integrins, dystroglycan, syndecans and Lutheran are cellular receptors for LM (Barczyk *et al.* 2009; Durbeej, 2010). The globular domains located in the N- and C-terminus of the LM α chains are critical for interactions with cellular receptors which trigger intracellular signalling (Suzuki *et al.* 2005).

Determining the function of specific LM isoforms by genetic knockout experiments turned out to be difficult. In particular, early lethality was encountered upon knock-out of several α , β and γ chains (Gustafsson and Fässler, 2000; Li *et al.* 2003; Rozario and DeSimone, 2010). Moreover, partial compensation by other isoforms masks the function of the knocked out isoform (Simon-Assmann *et al.* 2010). Furthermore, since LM are heterotrimeric molecules, it is difficult to assign a conclusive function to a particular $\alpha\beta\gamma$ combination upon deletion of a single chain by antibody staining. For example an anti-pan-LM antibody, that recognizes either the $\alpha 1$, $\beta 1$ or $\gamma 1$ chain, detects 11 distinct isoforms. Yet, specific single chain antibodies had been raised and are now available. They allowed to decipher expression of specific LM isoforms in blood vessels (Sixt *et al.* 2001; Patarroyo *et al.* 2002; Hallmann *et al.* 2005). In most tissues, only LM-411 and LM-511 are found in the endothelial BM (Hallmann *et al.* 2005). Since only certain LM isoforms are predominant in vascular BMs, it is assumed that they are critical for maintenance of vessel stability and/ or integrity. Formation of new vessels during angiogenesis requires degradation of the BM, a process in which EC are exposed to other LM isoforms such as LM-111, that are usually not expressed or weakly expressed in most healthy tissues but are present in the abnormal microenvironment. Most of the data reported in the present review, and summarized in **Table**

1, are based on *in vitro* and *in vivo* models that were applied to elucidate the angiogenic properties of LM (Cimpean *et al.* 2010; in press in this issue).

In vitro angiogenesis assays with reconstituted BM proteins

The first LM discovered was isolated from the matrix of the murine EHS tumour (Engelbreth-Holm-Swarm) and is now designated as LM-111 (Timpl *et al.* 1979). The antibody raised against the EHS LM preparation, formed by α 1, β 1 and γ 1 chains, was considered to exclusively recognize LM-111 which turned out to be wrong. Indeed, several LM isoforms share the α 1, β 1 or γ 1 chain and therefore can be recognized by the anti-pan laminin antibody. Yet, by using α 1 chain-specific antibodies it had been observed that α 1-containing LM are not ubiquitously expressed in BM but exhibit a limited distribution. This is in contrast to β 1 γ 1-containing LM forming trimers with α chains other than α 1 that are found ubiquitously in BM. LM-111 is expressed during early embryogenesis (Sasaki *et al.* 2002) where it plays an essential role in developing kidney tubules, lung alveoli and submandibular glands (Ekblom *et al.* 2003). LM-111 is essential for embryogenesis due to its expression in the extraembryonic Reichert's BM. Thus it is not surprising that Lama1 knockout mice die by embryonic day 7 (Miner *et al.* 2004; Alpy *et al.* 2005). Despite a restricted expression in the adult, LM-111 is expressed in polarized tissues such as the mammary gland and the intestine, which suggests an essential role in cellular polarization in tissues with a high turnover and remodelling (Simo *et al.* 1991, Streuli *et al.* 1995; Virtanen *et al.* 2000; Simon-Assmann *et al.* 2010). But how LM-111 would induce or regulate polarization is unknown.

Several studies have characterised the behaviour of cells when placed on natural or reconstructed BM. The most widely used example is Matrigel, a commercialized cell culture matrix, extracted from the EHS tumour. EC cultured on Matrigel cease to proliferate, align and form capillary-like structures (Kubota *et al.* 1988; Pauly *et al.* 1992). Furthermore, Matrigel has been demonstrated to support the formation of tubules from EC *in vitro* as well as vascular networks when implanted into mice (Passaniti *et al.* 1992; Garrido *et al.* 1995). One major application of Matrigel is to support tumour grafting in murine xenograft experiments (Kleinman and Martin, 2005). Yet, due to several growth factors and other components in Matrigel, conclusions to what molecule the result relates to should be taken with caution (Hughes *et al.* 2010). As LM-111 is the major glycoprotein found in Matrigel, several studies aimed to define its precise function in regulating angiogenesis. In particular, LM-111 recombinant proteins, proteolytic fragments and synthetic peptides have been generated and were used to identify and characterize functional domains of the molecule.

Pro-angiogenic properties of sequences within the LM α 1 chain

It has been shown that matrix-derived synthetic peptides, corresponding to active sites in proteins, could have biological activities on their own. Using synthetic peptides from the α 1 chain, Grant *et al.* (1992, 1994) had demonstrated that an IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) containing-peptide (**Figure 2**) promoted EC migration and invasion into Matrigel and increased angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane assay (CAM). The angiogenic activity of this IKVAV-containing peptide was further confirmed in an *in vivo* model when the peptide was co-injected with melanoma cells and Matrigel into nude mice. Under this condition, the peptide enhanced tumour vascularisation as well as tumour growth over that observed with melanoma cells or Matrigel alone (Kibbey *et al.* 1992). In order to identify additional active sites within the LM molecule, a screen was performed on 405 synthetic partially overlapping peptides that were derived from the α 1 chain (Nomizu *et al.* 1995; Malinda *et al.* 1999). Using the HUVEC tube formation and EC rat aortic ring sprouting assay, eight peptides A10, A13, A55, A64, A118, A119, A124 and A203 were found to be

active in angiogenesis (**Figure 2**). Of interest is the fact that the $\alpha 1$ chain peptides are predominantly clustered in the first, second and third globular domain (Malinda *et al.* 1999). The A13 peptide (RQVFQVA γ IIKA), which was the most active in the angiogenesis assays, also promoted melanoma lung colonization (Kuratomi *et al.* 1999).

The synthetic peptide AG73 derived from the LM $\alpha 1$ chain carboxy-terminal globular domain (G domain, LG4 module) (**Figure 2**) turned out to be a very potent stimulator of angiogenesis (Mochizuki *et al.* 2007). Again, this peptide promoted angiogenesis in the aortic ring and in the CAM assays. Interestingly, peptides with homologous sequences in LM $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ or $\alpha 5$ chain were not as angiogenic as was AG73 (Mochizuki *et al.* 2007) which suggests a particular role of the intact as well as the proteolysed LM $\alpha 1$ chain in angiogenesis.

In accordance with this pro-angiogenic effect of the LM $\alpha 1$ chain, its overexpression by transfection in human colon adenocarcinoma cells increased angiogenesis and growth of the arising tumours and promoted recruitment of stromal cells (De Arcangelis *et al.* 2001; **figure 3 panel I**). In contrast, mutated versions of Lama1 in zebrafish morphants delayed or reduced EC differentiation, formation of capillaries as well as blood flow in the hyaloid vasculature (Semina *et al.* 2006). In mice with a recessive mutant Lama1 gene that was generated by chemical mutagenesis, EC development was also delayed. A more severe phenotype was observed in a Lama1 null mouse mutant that derived from Sox2-cre induced deletion of the floxed Lama1 gene (**Figure 3 panel II**). These mice were blind and exhibited tortuous vessels with persistence of hyaloid vessels (Edwards *et al.* 2010). This observation points at a crucial role of the LM $\alpha 1$ chain in proper retinal blood vessel development.

Pro- and anti-angiogenic properties located within the LM $\beta 1$ chain

As for the $\alpha 1$ chain, short synthetic peptides from the $\beta 1$ chain of LM were screened for their potential effect on EC adhesion in Matrigel, the aortic ring and the Boyden chamber assays (Nomizu *et al.* 1995; Malinda *et al.* 1999). Five peptides of the $\beta 1$ chain, B49, B77, B97, B160 and B7, were found to be active in angiogenesis (Figure 2). Yet, another sequence located in the $\beta 1$ chain had an opposite biological activity since it inhibited angiogenesis (Figure 2). Kubota *et al.* (1988) and Grant *et al.* (1989) found that a peptide containing the YIGSR sequence blocked the morphological differentiation of EC into capillary-like structures. This peptide also inhibited embryonic angiogenesis in the CAM assay (Sakamoto *et al.* 1991). Of interest is the fact that this peptide also inhibited experimental metastasis formation of melanoma cells (Iwamoto *et al.* 1987) suggesting that this peptide may not only block angiogenesis but also other steps during metastasis. Thus this peptide may potentially find application in cancer therapy.

Activation of signalling pathways in response to cell interactions with LM-111

Binding of angiogenic peptides of the LM $\alpha 1$ and $\gamma 1$ chains to $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins

To search for angiogenic sequences 154 overlapping synthetic peptides were generated that span the entire LM $\gamma 1$ chain (Ponce *et al.* 1999). The authors identify 7 peptides (C16, C25, C30, C38, C64, C75 and C102) that inhibited Matrigel-induced formation of capillary-like structures of EC by competition. Moreover, these peptides promoted angiogenesis in the aortic ring assay and in the CAM assay (Figure 2). The most active peptide C16 (KAFDITYVRLK) bound to integrins $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ (Ponce *et al.* 2001). Unexpectedly, the angiogenic peptide A13 located in the N-terminal globular domain of the LM $\alpha 1$ chain represented a redundant active site found in the C16 peptide (Ponce and Kleinman, 2003). Both peptides A13 and C16 bound to the same integrin and competed with each other in cell

adhesion and angiogenesis. Binding of these peptides to integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ was rather surprising since these integrins are not classical LM receptors (Avraamides *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008). Since intact LM do not bind to these integrins it is likely that the A13 and C16 sequences represent cryptic sites. Whether and how they are released from the intact molecule is not known. Although A13 and C16 bound to integrins, they did not induce classical integrin signalling such as activation of mitogen-activated protein kinase or serine/threonine kinases (Ponce *et al.* 2001). There is nothing known about what signalling is induced upon ligation of the integrins by these laminin peptides. It is intriguing that the A13 or C16 sequences are found in almost all LM isoforms: A13 in LM-111 and LM-121, and C16 in 11 out of the 15 isoforms. This high conservation may indicate the importance of this sequence for development and angiogenesis.

In cancer, a peculiar mechanism of tumour cell dissemination was described where tumour cells migrated along the external surface of vessels; this mechanism is called extravascular migratory metastasis (Lugassy and Barnhill, 2007). In the CAM assay, the C16 peptide was shown to increase extravascular migration of human GFP labelled melanoma cells along vessels although it was not addressed whether it affected angiogenesis (Lugassy *et al.* 2009). Because of the putative significance of this LM γ 1 sequence in modulating angiogenesis, Ponce *et al.* (2003) had searched for a more potent peptide and discovered C16Y which was five times more active. Intraperitoneal injections of this peptide also inhibited angiogenesis and growth of xenografted breast cancer cells in mice. The minimal active sequence of C16Y was identified as DFKLFAVY and presumably functions as an antagonist for integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ during angiogenesis. Since these integrins are a target in cancer therapy the described LM sequences blocking these integrins have the potential for drug development.

A cryptic RGD domain in the LM $\alpha 1$ chain

Binding of various integrins to extracellular ligands is a major initial event in cell-matrix interactions. EC and pericytes express a large subset of integrins that include typical LM receptors such as $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ (Avraamides *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008). Interestingly, the repertoire of integrins on EC changes during angiogenesis (Silva *et al.* 2008). Among these are integrins that recognize the well-known cell-adhesive RGD (Arg-Gly-Asp) site in matrix molecules. Yet, RGD sequences are rarely found in laminins. In the mouse $\alpha 1$ chain, a cryptic RGD site was identified and was located in the fragment P1 upon pepsin digestion (Aumailley *et al.* 1991). Although some conflicting results exist in the literature regarding the implication of this RGD site in regulating cell adhesion of EC to LM, it was shown that the differentiation of EC into tube-like structures required an initial integrin-dependent attachment to an RGD-containing sequence present in LM $\alpha 1$. This initial integrin-mediated interaction was followed by a cell-cell interaction through the YIGSR sequence on the LM $\beta 1$ chain (Grant *et al.* 1989; Aumailley *et al.* 1991). Thus proteolytic release of the RGD sequence from the $\alpha 1$ chain was necessary for cell adhesion. This raises the question about the role of this mechanism in normal tissue where proteolytic activity is low. Yet, this mechanism might be relevant in inflammatory and tumourigenic tissues that exhibit a high proteolytic activity.

Signalling events triggered by cell adhesion to LM-111

It is not yet clear how small peptides or the entire LM-111 molecule exhibit a biological response. In the CAM assay, Dixelius *et al.* (2004) demonstrated that intact LM-111 was as potent as FGF-2 to induce angiogenesis, that vascular development in embryoid bodies was stimulated in a synergistic manner by FGF-2 together with LM-111, and that formation of tubular structures was accompanied by increased expression of Jagged-1, a ligand of the

Notch receptor family and a marker of endothelial differentiation. They further showed that the combined presence of LM-111 and FGF-2 led to a transient increase of FGFR-1, VEGF-A and VEGFR-2 mRNA levels. Yet, LM-111 failed to activate classical angiogenic growth factor-induced signalling such as phospho-ERK-1/-2 or phospho-Akt. Cell attachment to LM is mediated by cell adhesion receptors such as integrins, syndecans, dystroglycan and Lutheran (Durbeej, 2010). Although studies were not done with EC, one can assume that the pro-angiogenic A13 peptide of the α 1 chain likely binds to an integrin containing the β 1 subunit since an interaction of A13 with a β 1 integrin was found in HT-1080 human fibrosarcoma cells and hepatocytes (Nomizu *et al.* 1998; Kikkawa *et al.* 2009). Moreover, the angiogenic AG73 peptide also found in the α 1 chain, was shown to interact with members of the transmembrane syndecan family of proteoglycans, syndecan-1 and presumably syndecan-4 (Hoffman *et al.* 1998; Mochizuki *et al.* 2007) that are critical regulators of angiogenesis.

Potential role of proteolytic processing of LM in angiogenesis

Except a role of Notch and VEGF signalling (Jakobsson *et al.* 2009), little is known how EC are stimulated to form a branch from a parental vessel. The BM itself or BM associated factors and enzymes might play a decisive role in branching of capillaries. Matrix remodelling is a key step in vessel branching and LM-111 might play a role in this process. In particular, the IKVAV-containing peptide in the α 1 chain was shown to promote endothelial collagenase IV activity (Grant *et al.* 1992; Schnaper *et al.* 1993). This peptide also increased plasminogen activation, resulting in the degradation of LM, as well as of matrix metalloproteinase MMP9 in melanoma cells and macrophages (Stack *et al.* 1993; Faisal Khan and Falcone, 1997). An increased protease activity could also trigger release of matrix bound growth factors such as VEGF, FGF, PDGF and thus the action of IKVAV would be rather indirect. In contrast to the IKVAV peptide, all other angiogenic peptides derived from the globular domains of the LM α 1 chain, including the A13 sequence, did not stimulate MMP activity in a zymogram assay (Malinda *et al.* 1999).

In summary, several sequences within the LM α 1-, β 1- and γ 1 chains regulate angiogenesis. Some of them such as the RGD and IKVAV sites are presumably cryptic in the intact LM-111 molecule and need to be unmasked by proteases to be active. These sequences promote early steps in angiogenesis such as cell migration, formation of differentiated spindle-shaped cells, production of proteases, loss of contact inhibition, and expression of matrix molecules that facilitate cell attachment to the ECM (Grant *et al.* 1994). Another class of pro-angiogenic peptides located in the N-terminal domain of the LM α 1 chain, such as the A13 peptide, is also active in context of the intact molecule and may be accessible upon a conformational change. The reason for the large number of pro-angiogenic peptides in LM-111 is not clear. Depending on the surrounding microenvironment and proteolytic activities, alternative peptides may be generated from the LM α 1 chain which may modulate angiogenesis by different mechanisms. Finally, synthetic peptides of LM-111 could be used to improve our understanding of the biological functions of this laminin in angiogenesis and may provide the basis for drug development to regulate angiogenesis in pathological situations.

The LM α 4 chain regulates EC behaviour and angiogenesis

The LM α 4 chain is a component of two laminins, LM-411 (α 4 β 1 γ 1) and LM-421 (α 4 β 2 γ 1) and is widely distributed in vascular endothelial BMs of several tissues. Since the β 2, β 3, γ 2 and γ 3 chains have not been found in capillaries, LM-411 is presumably the only LM trimer in the capillary BMs of most embryonic and neonatal tissues (Hallmann *et al.*

2005). The widespread and exclusive expression of the $\alpha 4$ chain in BM of developing microvessels suggests a role in angiogenic processes. Indeed, it was shown that the LM $\alpha 4$ subunit has a strong impact on EC behaviour (Gonzales *et al.* 2001; Gonzalez *et al.* 2002). In addition it was demonstrated that the G domain of LM $\alpha 4$ is a specific high affinity ligand for $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins. These two integrins together with the $\alpha 6\beta 1$ integrin cooperatively mediated EC interactions with $\alpha 4$ containing LM by promoting cell adhesion and migration (Gonzalez *et al.* 2002). Similarly, the overexpression of the LM $\alpha 4$ chain in human dermal microvascular EC promoted cell spreading and migration in a scratch wound assay and accelerated angiogenic tube formation in collagen gel overlay assays (Li *et al.* 2006). By using a panel of dominant-negative mutants of Rho family GTPases, Fujiwara *et al.* (2004) showed the importance of Rac activation in $\alpha 6\beta 1$ integrin-mediated EC adhesion and migration on LM-411. Other *in vitro* studies suggested that the $\alpha 4$ LM chain can directly regulate cell proliferation and inhibit apoptosis. In particular an antibody directed against the G domain was able to trigger a mitochondrial-dependent programmed cell death pathway in EC (DeHahn *et al.* 2004) which suggests that cell binding to the LM $\alpha 4$ chain is essential for survival. The authors further showed that the anti-apoptotic signal emanating from the interaction with the $\alpha 4$ LM chain was transduced via integrin $\alpha 3\beta 1$ and/or $\alpha 6\beta 1$.

Studies of LM- $\alpha 4$ deficient mice revealed that this chain is not required for blood vessel formation; yet, Lama4 knock-out mice displayed certain vascular abnormalities. In particular they exhibited an unstable and weakened capillary BM. Rupturing of the microvascular wall led to mild transient haemorrhages in the skin of newborn mice. Within the first week after birth, however, the vascular phenotype of Lama4 deficient mice disappeared most likely due to compensation by LM-511 which was largely deposited under these conditions (Thyboll *et al.* 2002). In adult Lama4 null corneas, the formation of new blood vessels was dramatically affected. In response to FGF-2 an extensive bleeding and disorganisation of the microvessel growth was observed in Lama4 deficient corneas (Thyboll *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2004). In contrast to most microvessels where the $\alpha 4$ chain is produced by EC, in the kidney LM $\alpha 4$ is expressed by specialized pericytes, the mesangial cells. In Lama4 null mice the lack of the LM $\alpha 4$ chain caused a progressive renal lesion which was presumably due to deregulated PDGF-R β signalling. In consequence pericyte recruitment and vessel lining was reduced (Abrass *et al.* 2010).

Comparing the expression between normal brain tissue and gliomas using a gene array approach combined with qRT-PCR and immunohistochemical staining revealed that the Lama4 gene was consistently overexpressed in the tumorigenic blood vessels as opposed to low levels found in normal brain tissue (Ljubimova *et al.* 2001). Moreover, in gliomas, LM-411 potentially plays a role in tumour regrowth since a high LM-411 expression correlated with a more rapid recurrence, but the underlying mechanism is unknown. Data suggest that during tumour progression a switch from $\beta 2$ -containing LM to LM with a $\beta 1$ chain occurs. Indeed, normal blood vessels of brain and breast tissue expressed LM-421 which was in contrast to vessels in high grade gliomas and breast carcinoma that expressed LM-411 (Fujita *et al.* 2005; Ljubimova *et al.* 2006).

Yet, opposing data on the role of LM $\alpha 4$ on tumour angiogenesis were obtained by Zhou *et al.* (2004). To determine the role of LM-411 in tumour growth and angiogenesis, they xenografted lung carcinoma cells under the skin of a Lama4 knockout mouse. Under these conditions the absence of host LM $\alpha 4$ accelerated tumour growth in comparison to control mice expressing the Lama4 gene. This was accompanied by an increased tumour

vascularisation in the Lama4 knockout mice. These surprising data could be due to compensation by LM α 5 which may be induced in the absence of LM α 4. An expression analysis of LM α 5 in tumours of Lama4 knockout mice may clarify this issue.

Potential role of LM α 5 during angiogenesis

LM α 5 expression is developmentally regulated in vessels. In the mouse embryo, the α 5 chain is only detected in large vessels; its expression in capillaries becomes evident only at 3-4 weeks after birth (Sorokin *et al.* 1997). Data on the influence of α 5-containing LM on angiogenesis are still fragmentary and not conclusive. Targeted inactivation of the Lama5 gene encoding the LM α 5 chain resulted in disturbed placental vessel development (Miner *et al.* 1998). As the Lama5 knockout embryo died at day 17, no data on later stages are available. But in the very early Lama5 knockout embryo it appears that the lack of this LM chain affects vessel stability and / or maturation (Miner, 2008). Using recombinant human LM-511 as substratum, Doi *et al.* (2002) showed that human vein EC adhered and migrated on this LM molecule in an integrin α 2 β 1- and α 3 β 1-mediated manner. Quantitative cell adhesion assays revealed that cells bound to LM-511 upon ligation of β 1 and α v β 3 integrins which acted in concert with Lutheran, another α 5 specific transmembrane adhesion receptor (Vainionpää *et al.* 2006). Yet, α 5-containing LM seems to be unable to stimulate angiogenesis in the embryoid body model when ES cells were cultured together with purified LM. This is in contrast to LM-111 that had strongly induced angiogenesis (Dixelius *et al.* 2004).

It is possible that there is a balance between LM α 4 and LM α 5 chains since both are expressed in blood vessels. In the Lama4 knockout situation, compensation by the α 5 chain presumably rendered mice viable. In contrast, Lama5 knockout mice are embryonic lethal despite local compensation in certain organs by other LM (Miner *et al.* 1998; Bolcato-Bellemin *et al.* 2003). No data are available regarding the vessel BM composition in the Lama5 mutants. In Lama4 knockout mice an increased expression of LM α 5 was found that presumably stabilized the vessels. But these vessels were far from normal since they were dilated and fragile which may explain why mice developed cardiomyopathy with increased age (Thyboll *et al.* 2002; Wang *et al.* 2006b). A well controlled balance between LM α 4 and LM α 5 chain expression in the endothelial BM was demonstrated in an experimental autoimmune encephalomyelitis model (Wu *et al.* 2009). The authors showed that focal extravasation of leukocytes via integrin α 6 β 1 was due to the patchy distribution of LM α 5 in the BM. Transmigration of leukocytes occurred preferentially at sites that expressed high α 4 containing LM but low amounts of α 5 LM showing for the first time an instructive role of endothelial BM on T lymphocyte migration.

To identify adhesive sequences within LM α 5, 113 overlapping synthetic peptides of the globular domains had been tested in cell attachment assays (Hibino *et al.* 2004). Four peptides (A5G27, A5G73, A5G81, A5G101) were found to inhibit FGF-induced angiogenesis in the CAM assay. One of these peptides, A5G27, was able to bind the CD44 receptor that is present on EC and inhibited angiogenesis in a dominant-negative manner. It is interesting to note that CD44 is expressed in the vasculature of tumours as a result of an exposure to angiogenic factors such as bFGF and VEGF (Griffioen *et al.* 1997). Whether this peptide is generated *in vivo* or whether the A5G27 sequence is binding to CD44 in context of the intact LM molecule is not known. This information would be useful for tumour angiogenesis intervention strategies.

LM-332 in matrix channels and the vasculature

LM-332, composed of an $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ subunit, is typically expressed in the BM of epithelial tissues such as skin, stomach, lung, breast and intestine. In stratified epithelia such as the skin, LM-332 is detected in type I hemidesmosomes, adhesion structures containing $\alpha 6\beta 4$ integrin, cytokeratins and several hemidesmosomal proteins (de Pereda *et al.* 2009). Because LM-332 plays a key role in controlling migration of cells (Giannelli and Antonaci, 2001), it is possible that it plays a similar role in mesodermal tissues. The $\gamma 2$ chain, found in LM-332 and LM-522, is expressed in the intestinal smooth muscle coat (Orian-Rousseau *et al.* 1996) and at low levels in the tunica media of aorta and pulmonary arteries (Kingsley *et al.* 2002a). Interestingly these vascular smooth muscle cells responded to soluble growth factors such as PDGF and TGF- $\beta 1$ by increasing their endogenous levels of LM-332 while reducing adhesion to this substratum (Kingsley *et al.* 2002a). PDGF-BB enhanced cell migration of vascular smooth muscle cells on LM-332 via an ERK1/2 signalling pathway (Kingsley *et al.* 2002b). The importance of the mesenchyme-derived cells in producing and secreting LM-332 is further supported by interspecies tissue recombination experiments using endodermal and mesenchymal anlagen of mouse and chicken, respectively. Species-specific antibodies were used to show that the LM $\gamma 2$ chain was deposited by the mesenchymal cells only (Orian-Rousseau *et al.*, 1996). These data suggest that LM $\gamma 2$ -containing LM might be important for mesodermal tissue identity.

The available literature regarding the function of LM-332 in vascular biology is limited. Adhesion of cells to LM-332 appears to promote migration through integrin $\alpha 3\beta 1$ and to facilitate hemidesmosome formation through integrin $\alpha 6\beta 4$ (Litjens *et al.* 2006). Kikkawa *et al.* (1996) showed that EC bound to this isoform (formerly called ladsin) via integrin $\alpha 3\beta 1$ and this interaction increased cell migration. In contrast, Homan *et al.* (1998) demonstrated that a LM-332 rich matrix in concert with integrin $\alpha 6\beta 4$ and vimentin promoted the assembly of stable hemidesmosome-like adhesion structures in EC. This knowledge is already applied in bioengineering of biomedical implants (Kidd and Williams, 2004; Kidd *et al.* 2005). It was shown that LM-332 enriched polytetrafluoroethylene (PTFE) scaffolds (a porous polymer that permits vessel ingrowth through the pores of the material) increased tissue vascularisation. More importantly, the authors had shown that LM-332 accelerated neovascularisation upon implantation of the PTFE scaffolds into the mouse (Kidd *et al.* 2005).

In highly aggressive melanomas, cells form a matrix network that appears to be connected to the vasculature and that has been coined “vasculogenic mimicry” (Maniotis *et al.* 1999) or tubular channel formation (Kaariainen *et al.* 2006). These conducting structures are rich in LM $\gamma 2$ containing laminins but are not lined by EC thus potentially recapitulating embryonic vasculogenesis (Hendrix *et al.* 2003). These channels may play a role in transporting plasma and blood and potentially serve as short distance route for tumour cells (Kaariainen *et al.*, 2006). Interestingly, a high level of similarity between the vasculogenic mimicry of tumours and the ancestral vascular tube formation -found in the invertebrate blood vessels- was noted (Kucera *et al.* 2009). Similar to the invertebrate blood vessels, LM-containing ECM lined these vessels within the tumour. Upregulation of the *lamc2* gene (encoding the $\gamma 2$ chain) and of other genes implicated in angiogenesis and vasculogenesis such as cadherin 15, ephrin receptor A2 and several MMPs was found in aggressive melanoma cells (Seftor *et al.* 2001; Hendrix *et al.* 2003). An important role of $\gamma 2$ LM in tube formation was demonstrated upon reducing expression of this isoform by an antisense oligonucleotide knockout strategy in

aggressive melanoma cells. Downregulation of the LM $\gamma 2$ chain resulted in the inability to form vasculogenic-like networks in 3D-cultures (Seftor *et al.* 2001). A similar matrix-based tube formation had been described in various carcinomas (Hendrix *et al.* 2003; Kucera and Lammert, 2009). The potential role of LM $\gamma 2$ in tumour angiogenesis is unknown. It is interesting to note that cathepsin S cleaved the $\gamma 2$ chain giving rise to pro-migratory fragments (Giannelli and Antonaci, 2001). Deficiency of cathepsin S in the RIP1-Tag2 model of pancreatic islet carcinogenesis impaired angiogenesis (Wang *et al.* 2006a).

Role of LM during BM assembly in angiogenesis

An important step in angiogenesis is the formation of an endothelial lumen giving rise to a tube. On their basal surface EC are first in contact with the BM which maintain the tube structure. This BM and in particular LM appear to be instrumental in forming capillary-like structures (Kubota *et al.* 1988) by potentially serving as guiding cue for pericytes that will extend cellular processes to contacting EC (von Tell *et al.* 2006). The recruitment of pericytes to EC-lined tubes will stabilize the vessels and lead to neosynthesis and assembly of BM molecules (Davis *et al.* 2007) which had been nicely demonstrated in a coculture assay (Stratman *et al.* 2009). By using species-specific primers in heterospecific cocultures (human EC with bovine pericytes) it was shown that certain LM chains were induced which did not occur if each cell type was cultured alone (Stratman *et al.* 2009). In particular the $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$ and $\gamma 1$ chains were induced in the coculture setting which points at a possible role of the associated LM, most importantly LM-511 and LM-521 in vascular BM assembly (Miner and Yurchenco, 2004). Coincident with these events, upregulation of integrins $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ occurred in EC-pericyte cocultures that may strengthen the physical interaction between cells and their substratum (Stratman *et al.* 2009). These findings confirm the essential role of heterotypic cell-cell interactions in controlling BM matrix assembly, a phenomenon not restricted to the vascular BM (Simon-Assmann *et al.* 2010). These data also emphasise the active participation of pericytes in vessel stabilisation since they are able to produce multiple LM isoforms and type IV collagen (Jeon *et al.* 1996). The tight interaction between pericytes and EC is presumably further stabilized by cell-cell contacts through integrins and the vascular cell adhesion molecule 1 (Desgrosseilier and Cheresh, 2010). Importantly, abnormal interactions of pericytes with EC or the complete lack of pericytes play a role in the pathogenesis of some diseases such as cancer and diabetes (Davis *et al.* 2007; Huang *et al.* 2010).

Another example of an important role of BM molecules in the vasculature had been described in the endocrine pancreas (Nikolova *et al.* 2006). The authors showed that EC provided pancreatic β -cells with a vascular BM which was essential for proliferation and insulin secretion. First, β -cells secreted VEGF-A which attracted EC and triggered formation of a LM-rich BM coat around the capillaries. Subsequently, integrin mediated β -cell interactions with LM promoted insulin expression and β -cell proliferation. In summary it appears that a coordinated binding of cells to LM and other BM components serves as prerequisite for a stable interaction between EC and pericytes that would allow vessel maturation as well as insulin secretion of the endocrine pancreas.

Conclusion and future perspectives

Angiogenesis is a complex process that involves many participants. Amongst them the laminins within the BM not only provide a structural basis but also trigger cellular signalling, thus supporting or inhibiting vessel formation. These opposing effects of LM on angiogenesis do reside in their structural configuration that differs if LM are linked to other BM molecules

or to cell adhesion receptors. Also cell responses are different if the LM are present as intact molecules or as peptides. The use of recombinant LM proteins or peptides allowed to decipher cell binding sites on individual LM chains. This approach did not take into account glycosylation and the native folding found in the entire molecule, and thus might have missed some interactions. Nevertheless, the fact that some of these sequences were cryptic points to the notion that proteolysis within the tissue is important to generate active or inactive sites. Proteolytic processing of LM appears to be particularly important in tumour angiogenesis.

Since BM are critically involved in blood vessel formation in normal and pathological tissue homeostasis their components are currently an area of intensive research for identification of novel anti-cancer therapies and controlled angiogenesis in tissue repair. One difficulty to encounter is that vascular BMs in distinct tissues and organs exhibit different compositions. In contrast to most organs that express LM-411 and LM-511, blood vessels in the central nervous system express LM-111 and LM-211 (Ljubimova *et al.* 2001). Under pathological conditions such as in tumour vessels other LM isoforms are expressed than in normal tissue. In particular $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\beta 2$ containing LM are frequently found in tumour microvessels while they are usually not expressed in healthy tissues (Patarroyo *et al.* 2002). In addition to LM, also other molecules of the BM are critically involved in regulating vessel homeostasis. Type IV collagen is one such example that directly interacts with LM which may affect cell responses to LM. Moreover, in contrast to full length type IV collagen that supports and promotes angiogenesis, peptides of the N-terminal domain of collagen type IV, known as arrestin, canstatin and tumstatin, are potent inhibitors of angiogenesis (Kalluri, 2003). Similar ambiguous properties, supporting angiogenesis as intact molecule but inhibiting angiogenesis when presented as peptides may also apply to LM. Yet, the underlying mechanisms need to be investigated in more detail.

In the future, a combination of complete or conditional deletion of LM-subunit genes in EC and pericytes will further improve our understanding of the particular function of LM in developmental and pathological angiogenesis. In this respect transgenic mice expressing Cre recombinase by cell type specific promoters such as the EC specific Tie-1, Tie-2, VE-cadherin promoters or the pericyte specific PDGF-R β promoter will be useful to remove floxed LM genes.

Finally, the knowledge about the function of LM in the BM of the vasculature can also be used for tissue engineering and tissue repair. Cells derived from host organs are hampered to assemble into a functional tissue without a proper scaffold of a BM and connective tissue. In mice Matrigel presents a scaffold that supports growth of grafted cells (Kleinman and Martin, 2005). But for tissue engineering in humans the mouse-derived Matrigel cannot be used since it would raise an antigenic response. Therefore artificial biomimetic matrices have to be designed to support BM assembly and cell attachment that would provide signals for cell growth and differentiation (Lutolf and Hubbell, 2005). One step in direction of tissue engineering had been done by Nakamura *et al.* (2008 and 2009). The authors had developed biomimetic supports with collagen-binding activities that promoted the formation of a vascular network to provide artificial tissue substitutes as an alternative for donor tissue and organs.

Acknowledgments

The recent author's work has been supported by Inserm and grants from INCa (Institut National contre le Cancer) and ARC (Association pour la recherche sur le Cancer) to PSA and GO. CS and EM-B are recipients of grants from Ligue Contre le Cancer and the Atropatena Technological Equipment Company (Azerbaijan Republic), respectively. We also like to thank M. Kedinger for her constant support, C. Arnold and A. Klein for their skilful technical assistance throughout the years and Dr MM Edwards (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) for sharing data concerning the angiogenic properties in retina.

List of References

- ABRASS CK, HANSEN KM, PATTON BL (2010). Laminin alpha4-null mutant mice develop chronic kidney disease with persistent overexpression of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* 176: 839-849.
- ALPY F, JIVKOV I, SOROKIN L, KLEIN A, ARNOLD C, HUSS Y, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P, LEFEBVRE O (2005). Generation of a conditionally null allele of the laminin alpha1 gene. *Genesis* 43: 59-70.
- AUMAILLEY M, TIMPL R, RISAU W (1991). Differences in laminin fragment interactions of normal and transformed endothelial cells. *Exp Cell Res* 196: 177-183.
- AVRAAMIDES CJ, GARMY-SUSINI B, VARNER JA (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8: 604-617.
- BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D (2009). Integrins. *Cell Tissue Res* 339: 269-280.
- BOLCATO-BELLEMIN AL, LEFEBVRE O, ARNOLD C, SOROKIN L, MINER JH, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (2003). Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol* 15 :376-390.
- CIMPEAN AM, RAICA M, RIBATTI D (2010). A brief history of angiogenesis assays. *Int J Dev Biol in press in this issue*.
- DAVIS GE, KOH W, STRATMAN AN (2007). Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81: 270-285.
- DAVIS GE, SENGER DR (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 97: 1093-1107.
- DE ARCANGELIS A, LEFEBVRE O, MÉCHINE-NEUVILLE A, ARNOLD C, KLEIN A, RÉMY L, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (2001). Overexpression of laminin α 1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int J Cancer* 94: 44-53.
- DE PEREDA JM, ORTEGA E, ALONSO-GARCIA N, GOMEZ-HERNANDEZ M, SONNENBERG A (2009). Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* 3: 361-364.
- DEHAHN KC, GONZALES M, GONZALEZ AM, HOPKINSON SB, CHANDEL NS, BRUNELLE JK, JONES JCR (2004). The alpha4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. *Exp Cell Res* 294: 281-289.
- DESGROSELLIER JS, CHERESH DA (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9-22.
- DIXELIUS J, JAKOBSSON L, GENERSCH E, BOHMAN S, EKBLUM P, CLAESSION-WELSH L (2004). Laminin-1 promotes angiogenesis in synergy with fibroblast growth factor by distinct regulation of the gene and protein expression profile in endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 23766-23772.
- DOI M, THYBOLL J, KORTESMAA J, JANSSON K, IIVANAINEN A, PARVARDEH M, TIMPL R, HEDIN U, SWEDENBORG J, TRYGGVASON K (2002). Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 12741-12748.
- DURBEEJ M (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* 339: 259-268.
- EBLE JA, NILAND S (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design* 15: 1385-1400.

- EDWARDS MM, MAMMADOVA-BACH E, ALPY F, KLEIN A, HICKS WL, ROUX M, SIMON-ASSMANN P, SMITH RS, OREND G, WU J, PEACHEY NS, NAGGERT JK, LEFEBVRE O, NISHINA PM (2010). Mutations in Lama1 disrupt retinal vascular development and inner limiting membrane formation. *J Biol Chem* 285: 7697-7711.
- EKBLOM P, LONAI P, TALTS JF (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22: 35-47.
- FAISAL KHAN MF, FALCONE DJ (1997). Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 272: 8270-8275.
- FUJITA M, KHAZENON N, BOSE S, SEKIGUCHI K, SASAKI T, CARTER W, LJUBIMOV A, BLACK K, LJUBIMOVA J (2005). Overexpression of beta1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Cancer Research* 7: R411-R421.
- FUJIWARA H, GU J, SEKIGUCHI K (2004). Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8. *Exp Cell Res* 292: 67-77.
- GARRIDO T, RIESE HH, ARACIL M, PEREZ-ARANDA A (1995). Endothelial cell differentiation into capillary-like structures in response to tumour cell conditioned medium: a modified chemotaxis chamber assay. *Br J Cancer* 71: 770-775.
- GIANNELLI G, ANTONACI S (2001). Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin Exp Metastasis* 18: 439-443.
- GONZALES M, WEKSLER D, TSURUTA D, GOLDMAN RD, YOON KJ, HOPKINSON SB, FLITNEY FW, JONES JCR (2001). Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 12:85-100.
- GONZALEZ AM, GONZALES M, HERRON GS, NAGAVARAPU U, HOPKINSON SB, TSURUTA D, JONES JCR (2002). Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. *PNAS* 99: 16075-16080.
- GRANT DS, TASHIRO K-I, SEGUI-REAL B, YAMADA Y, MARTIN GR, KLEINMAN HK (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 58: 933-943.
- GRANT DS, KINSELLA JL, FRIDMAN R, AUERBACH R, PIASECKI BA, YAMADA Y, ZAIN M, KLEINMAN HK (1992). Interaction of endothelial cells with a Laminin-A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. *J Cell Physiol* 153: 614-625.
- GRANT DS, KIBBEY MC, KINSELLA JL, CID MC, KLEINMAN HK (1994). The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract* 190: 854-863.
- GRIFFIOEN AW, COENEN MJH, DAMEN CA, HELLWIG SMM, VAN WEERING HJ, VOOYS W, BLIJHAM GH, GROENEWEGEN G (1997). CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells. *Blood* 90: 1150-1159.
- GUSTAFSSON E, FÄSSLER R (2000). Insights into extracellular matrix functions from mutant mouse models. *Exp Cell Res* 261: 52-68.
- HALLMANN R, HORN N, SELG M, WENDLER O, PAUSCH F, SOROKIN LM (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85: 979-1000.
- HENDRIX MJ, SEFTOR EA, HESS AR, SEFTOR RE (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-421.
- HIBINO S, SHIBUYA M, ENGBRING JA, MOCHIZUKI M, NOMIZU M, KLEINMAN HK (2004). Identification of an active site on the Laminin alpha5 chain globular domain that binds to CD44 and inhibits malignancy. *Cancer Res* 64: 4810-4816.

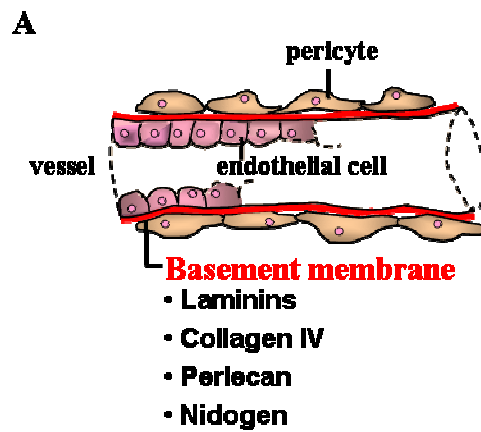
- HOFFMAN MP, NOMIZU M, ROQUE E, LEE S, JUNG DW, YAMADA Y, KLEINMAN HK (1998). Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. *J Biol Chem* 273: 28633-28641.
- HOMAN SM, MERCURIO AM, LAFLAMME SE (1998). Endothelial cells assemble two distinct $\alpha 6\beta 4$ -containing vimentin-associated structures: roles for ligand binding and the $\beta 4$ cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 111: 2717-2728.
- HUANG FJ, YOU WK, BONALDO P, SEYFRIED TN, PASQUALE EB, STALLCUP WB (in press). Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev Biol* DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.06.023.
- HUGHES CS, POSTOVIT LM, LAJOIE GA (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10: 1886-1890.
- INGBER DE (1992). Extracellular matrix as a solid-state regulator in angiogenesis: identification of new targets for anti-cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 3: 57-63.
- IWAMOTO Y, ROBEY FA, GRAF J, SASAKI M, KLEINMAN HK, YAMADA Y, MARTIN GR (1987). YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 238: 1132-1134.
- JAKOBSSON L, BENTLEY K, GERHARDT H (2009). VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 37,1233-1236.
- JEON H, ONO M, KUMAGAI C, MIKI K, MORITA A, KITAGAWA Y (1996). Pericytes from microvessel fragment produce type IV collagen and multiple laminin isoforms. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 856-861.
- KAARIAINEN E, NUMMELA P, SOIKKELI J, YIN M, LUKK M, JAHKOLA T, VIROLAINEN S, ORA A, UKKONEN E, SAKSELA O, HOLTTA E (2006). Switch to an invasive growth phase in melanoma is associated with tenascin-C, fibronectin, and procollagen-I forming specific channel structures for invasion. *J Pathol* 210:181-191.
- KALLURI R (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 422-433.
- KIBBEY MC, GRANT DS, KLEINMAN HK (1992). Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth - An in vivo matrigel model. *J Nat Cancer Inst* 84: 1633-1638.
- KIDD KR, WILLIAMS SK (2004). Laminin-5-enriched extracellular matrix accelerates angiogenesis and neovascularization in association with ePTFE. *J Biomed Mater Res A* 69: 294-304.
- KIDD KR, DAL PONTE D, STONE AL, HOYING JB, NAGLE RB, WILLIAMS SK (2005). Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene. *Tissue Eng* 11: 1379-1391.
- KIKKAWA Y, AKAOGI K, MIZUSHIMA H, YAMANAKA N, UMEDA M, MIYAZAKI K (1996). Stimulation of endothelial cell migration in culture by ladsin, a laminin-5-like cell adhesion protein. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 32: 46-52.
- KIKKAWA Y, TAKAHASHI N, MATSUDA Y, MIWA T, AKIZUKI T, KATAOKA A, NOMIZU M (2009). The influence of synthetic peptides derived from the laminin [alpha]1 chain on hepatocyte adhesion and gene expression. *Biomaterials* 30: 6888-6895.
- KINGSLEY K, RUST WL, HUFF JL, SMITH RC, PLOPPER GE (2002a). PDGF-BB enhances expression of, and reduces adhesion to, laminin-5 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1017-1022.
- KINGSLEY K, HUFF JL, RUST WL, CARROLL K, MARTINEZ AM, FITCHMUN M, PLOPPER GE (2002b). ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1000-1006.

- KLEINMAN HK, MARTIN GR (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *seminars in Cancer Biology* 15: 378-386.
- KUBOTA Y, KLEINMAN HK, MARTIN GR, LAWLEY TJ (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598.
- KUCERA T, STRILIC B, REGENER K, SCHUBERT M, LAUDET V, LAMMERT E (2009). Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS ONE* 4: e4132.
- KUCERA T, LAMMERT E (2009). Ancestral vascular tube formation and its adoption by tumors. *Biol Chem* 390: 985-994.
- KURATOMI Y, NOMIZU M, NIELSEN PK, TANAKA K, SONG SY, KLEINMAN HK, YAMADA Y (1999). Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin alpha-1 chain. *Exp Cell Res* 249: 386-395.
- LI J, ZHOU L, TRAN HT, CHEN Y, NGUYEN NE, KARASEK MA, MARINKOVICH MP (2006). Overexpression of Laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol* 126: 432-440.
- LI S, EDGAR D, FASSLER R, WADSWORTH W, YURCHENCO PD (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* 4: 613-624.
- LITJENS SHM, de PEREDA JM, SONNENBERG A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends in Cell Biol* 16: 376-383.
- LJUBIMOVA JY, LAKHTER AJ, LOKSH A, YONG WH, RIEDINGER MS, MINER JH, SOROKIN LM, LJUBIMOV AV, BLACK KL (2001). Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. *Cancer Res* 61: 5601-5610.
- LJUBIMOVA JY, FUJITA M, KHAZENON NM, LJUBIMOV AV, BLACK KL (2006). Changes in laminin isoforms associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Front Biosci* 11: 81-88.
- LUGASSY CM, BARNHILL RLM (2007). Angiotropic melanoma and extravascular migratory metastasis: A review. *Adv Anat Pathol* 14: 195-201.
- LUGASSY C, TORRES-MUNOZ JE, KLEINMAN HK, GHANEM G, VERNON S, BARNHILL RL (2009). Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. *J Cutan Pathol* 36: 1237-1243.
- LUTOLF MP, HUBBELL JA (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotech* 23: 47-55.
- MALINDA KM, NOMIZU M, CHUNG M, DELGADO M, KURATOMI Y, YAMADA Y, KLEINMAN HK, PONCE ML (1999). Identification of laminin α 1 and β 1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *Faseb J* 13: 53-62.
- MANIOTIS AJ, FOLBERG R, HESS A, SEFTOR EA, GARDNER LMG, PE'ER J, TRENT JM, MELTZER PS, HENDRIX MJC (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155: 739-752.
- MINER JH, CUNNINGHAM J, SANES JR (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 JH, YURCHENCO PD (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 255-284.

- MINER JH, LI C, MUDD JL, GO G, SUTHERLAND AE (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131: 2247-2256.
- MINER JH (2008). Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* 71: 349-356.
- MOCHIZUKI M, PHILP D, HOZUMI K, SUZUKI N, YAMADA Y, KLEINMAN HK, NOMIZU M (2007). Angiogenic activity of syndecan-binding laminin peptide AG73 (RKRLQVQLSIRT). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 459: 249-255.
- NAKAMURA M, MIE M, MIHARA H, NAKAMURA M, KOBATAKE E (2008). Construction of multi-functional extracellular matrix proteins that promote tube formation of endothelial cells. *Biomaterials* 29: 2977-2986.
- NAKAMURA M, YAMAGUCHI K, MIE M, NAKAMURA M, AKITA K, KOBATAKE E (2009). Promotion of angiogenesis by an artificial extracellular matrix protein containing the laminin-1 derived IKVAV sequence. *Bioconjugate Chemistry* 20: 1759-1764.
- NIKOLOVA G, JABS N, KONSTANTINOVA I, DOMOGATSKAYA A, TRYGGVASON K, SOROKIN L, FASSLER R, GU G, GERBER HP, FERRARA N (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and [beta] cell proliferation. *Dev Cell* 10: 397-405.
- NOMIZU M, KIM WH, YAMAMURA K, UTANI A, SONG SY, OTAKA A, ROLLER PP, KLEINMAN HK, YAMADA Y (1995). Identification of cell binding sites in the laminin α 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J Biol Chem* 270: 20583-20590.
- NOMIZU M, KURATOMI Y, MALINDA KM, SONG SY, MIYOSHI K, OTAKA A, POWELL SK, HOFFMAN MP, KLEINMAN HK, YAMADA Y (1998). Cell binding sequences in mouse laminin α 1 chain. *J Biol Chem* 273: 32491-32499.
- ORIAN-ROUSSEAU V, ABERDAM D, FONTAO L, CHEVALIER L, MENEGUZZI G, KEDINGER M, SIMON-ASSMANN P (1996). Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: Epithelial to mesenchymal shift for the laminin γ 2 chain subunit deposition. *Dev Dyn* 206: 12-23.
- PASSANITI A, TAYLOR RM, PILI R, GUO Y, LONG PV, HANEY JA, PAULY RR, GRANT DS, MARTIN GR (1992). A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67: 519-528.
- PATARROYO M, TRYGGVASON K, VIRTANEN I (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 12: 197-207.
- PAULY RR, PASSANITI A, CROW M, KINSELLA JL, PAPADOPOULOS N, MONTICONE R, LAKATTA EG, MARTIN GR (1992). Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells. *Circulation* 86: III68-III73.
- PONCE ML, KLEINMAN HK (2003). Identification of redundant angiogenic sites in laminin alpha1 and gamma1 chains. *Exp Cell Res* 285: 189-195.
- PONCE ML, NOMIZU M, DELGADO MC, KURATOMI Y, HOFFMAN MP, POWELL S, YAMADA Y, KLEINMAN HK, MALINDA KM (1999). Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma1 chain. *Circ Res* 84: 688-694.
- PONCE ML, NOMIZU MOTO, KLEINMAN HK (2001). An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the α 3 β 3 and α 5 β 1 integrins. *FASEB J* 15: 1389-1397.
- PONCE ML, HIBINO S, LEBIODA AM, MOCHIZUKI M, NOMIZU M, KLEINMAN HK (2003). Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 63: 5060-5064.

- RISAU W, FLAMME I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.
- ROZARIO T, DESIMONE DW (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol* 341: 126-140.
- SAKAMOTO N, IWAHANA M, TANAKA NG, OSADA Y (1991). Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDPGYIGSR-NH₂. *Cancer Res* 51: 903-906.
- SASAKI T, GILTAY R, TALTS U, TIMPL R, TALTS JF (2002). Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach. *Exp Cell Res* 275: 185-199.
- SCHNAPER HW, KLEINMAN HK, GRANT DS (1993). Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. *Kidney Int* 43: 20-25.
- SEFTOR RE, SEFTOR EA, KOSHIKAWA N, MELTZER PS, GARDNER LM, BILBAN M, STETLER-STEVENSON WG, QUARANTA V, HENDRIX MJ (2001). Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 61: 6322-6327.
- SEMINA EV, BOSENKO DV, ZINKEVICH NC, SOULES KA, HYDE DR, VIHTELIC TS, WILLER GB, GREGG RG, LINK BA (2006). Mutations in laminin alpha1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* 299: 63-77.
- SILVA R, D'AMICO G, HODIVALA-DILKE KM, REYNOLDS LE (2008). Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1703-1713.
- SIMO P, SIMON-ASSMANN P, BOUZIGES F, LEBERQUIER C, KEDINGER M, EKBLUM P, SOROKIN L (1991). Changes in the expression of laminin during intestinal development. *Development* 112: 477-487.
- SIMON-ASSMANN, P., SPENLE C., LEFEBVRE O., and KEDINGER, M. (2010). The role of the basement membrane as a modulator of intestinal epithelial-mesenchymal interactions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science - Molecular Biology of Digestive Organs* (Ed. P.M. Conn). Academic Press.
- SIXT M, ENGELHARDT B, PAUSCH F, HALLMANN R, WENDLER O, SOROKIN LM (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153: 933-946.
- SOROKIN LM, PAUSCH F, FRIESER M, KROGER S, OHAGE E, DEUTZMANN R (1997). Developmental regulation of the laminin α 5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol* 189: 285-300.
- STACK MS, GRAY RD, PIZZO SV (1993). Modulation of murine B16F10 melanoma plasminogen activator production by a synthetic peptide derived from the laminin A chain. *Cancer Res* 53: 1998-2004.
- STRATMAN AN, MALOTTE KM, MAHAN RD, DAVIS MJ, DAVIS GE (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114: 5091-5101.
- STREULI CH, SCHMIDHAUSER C, BAILEY N, YURCHENCO P, SKUBITZ APN, ROSKELLEY C, BISSELL MJ (1995). Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol* 129: 591-603.
- SUZUKI N, YOKOYAMA F, NOMIZU M (2005). Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res* 46: 142-152.
- THYBOLL J, KORTESMAA J, CAO R, SOININEN R, WANG L, IIVANAINEN A, SOROKIN L, RISLING M, CAO Y, TRYGGVASON K (2002). Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* 22: 1194-1202.

- TIMPL R, ROHDE H, ROBEY PG, RENNARD SI, FOIDART JM, MARTIN GR (1979). Laminin. A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937.
- VAINIONPAA N, KIKKAWA Y, LOUNATMAA K, MINER JH, ROUSSELLE P, VIRTANEN I (2006). Laminin-10 and Lutheran blood group glycoproteins in adhesion of human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C764-C775.
- VIRTANEN I, GULLBERG D, RISSANEN J, KIVILAAKSO E, KIVILUOTO T, LAITINEN LA, LEHTO VP, EKBLOM P (2000). Laminin α 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res* 257: 298-309.
- VON TELL D, ARMULIK A, BETSHOLTZ C (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 312: 623-629.
- WANG B, SUN J, KITAMOTO S, YANG M, GRUBB A, CHAPMAN HA, KALLURI R, SHI GP (2006a). Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 281: 6020-6029.
- WANG J, HOSHIJIMA M, LAM J, ZHOU Z, JOKIEL A, DALTON ND, HULTENBY K, RUIZ-LOZANO P, ROSS J, TRYGGVASON K, CHIEN KR (2006b). Cardiomyopathy associated with microcirculation dysfunction in laminin alpha4 chain-deficient mice. *J Biol Chem* 281: 213-220.
- WU C, IVARS F, ANDERSON P, HALLMANN R, VESTWEBER D, NILSSON P, ROBENEK H, TRYGGVASON K, SONG J, KORPOS E, LOSER K, BEISSERT S, GEORGES-LABOUESSE E, SOROKIN LM (2009). Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain. *Nat Med* 15: 519-527.
- YURCHENCO PD, PATTON BL (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* 15: 1277-1294.
- ZHOU Z, DOI M, WANG J, CAO R, LIU B, CHAN KM, KORTESMAA J, SOROKIN L, CAO Y, TRYGGVASON K (2004). Deletion of Laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice. *Cancer Res* 64: 4059-4063.



B **Laminin isoforms**

Name	Chain composition
Laminin-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$
Laminin-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$
Laminin-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$
Laminin-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$
Laminin-311	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$
Laminin-321	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$
Laminin-332	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$
Laminin-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$
Laminin-522	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$
Laminin-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

Figure 1: The BM constituents in vessels and presentation of the LM family. (A) In a quiescent capillary a BM separates EC from supporting cells such as pericytes and the connective tissue. The BM is composed of 4 major types of molecules: LM, collagen type IV, perlecan and nidogen. (B) The 15 different LM isoforms are composed of α , β and γ chains forming hetrotrimers. Name and chain composition are presented.

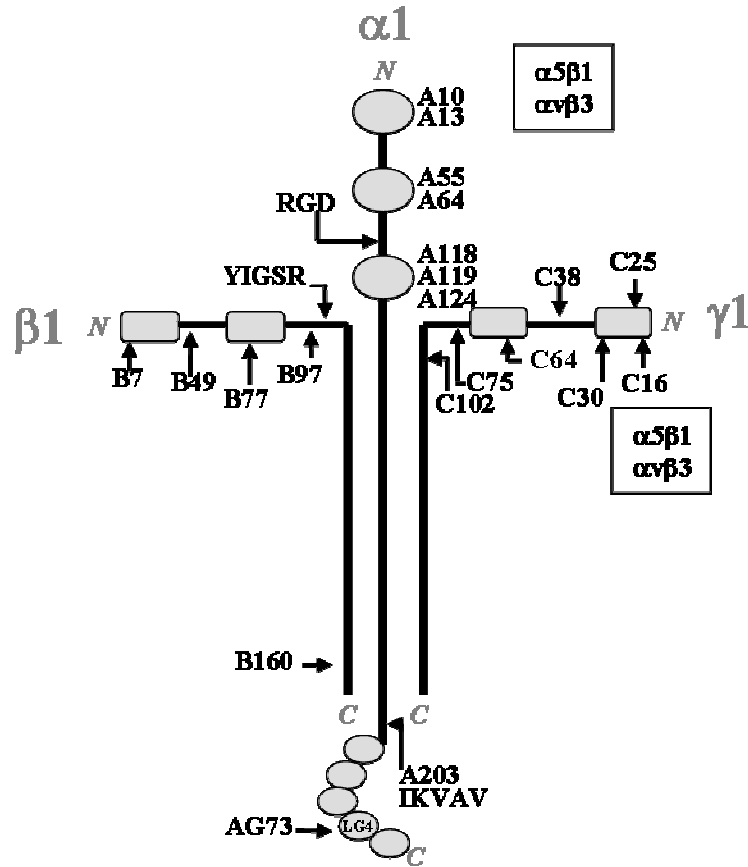


Figure 2: Schematic model of the LM-111 molecule ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) and its peptide domains active on EC. The location of LM-111 synthetic peptides that act on angiogenesis is indicated by arrows. Most of the identified peptides located on the α , β or γ arm of LM (designated respectively by A, B or C letters) are positively regulating EC behaviour. Peptide YIGSR located on the $\alpha 1$ chain inhibits angiogenesis. Peptides A13 or C16 bind to integrin $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ receptors whereas intact LM-111 does not bind to these integrins. Note that B7 peptide is located within the putative signal sequence of the $\beta 1$ chain. Globular domains of LM-111 are represented in grey. N, amino terminus domain; C, carboxy terminus domain; LG4, LM C-terminal G domain (module 4).

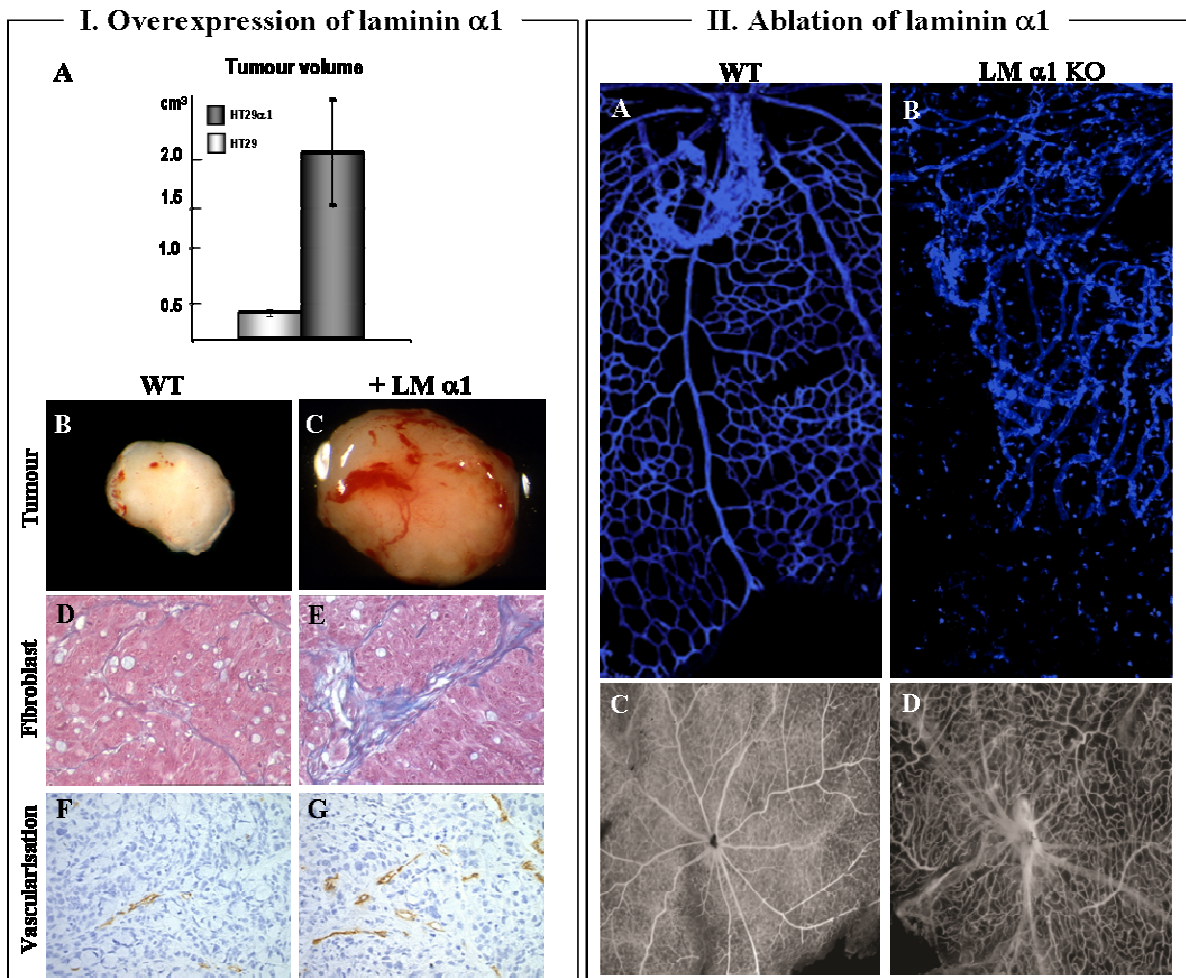


Figure 3: Documentation of the proangiogenic properties of the LM $\alpha 1$ chain

Panel I: Ectopic expression of LM $\alpha 1$ under control of the cytomegalovirus promoter in HT29 colorectal carcinoma cells that do not express endogenously LM $\alpha 1$ in cell culture. Overexpression of LM $\alpha 1$ caused an increased tumour growth (**A**, **C** versus **B**), a strong recruitment of fibroblasts (Masson's Trichrome staining, **E** versus **D**) and enhanced angiogenesis (immunostaining for CD31, **G** versus **F**) upon xenografting under the skin of nude mice (De Arcangelis *et al.* 2001).

Panel II: The absence of LM $\alpha 1$ in knockout mice interfered with normal blood vessel development in the retina (Edwards *et al.* 2010). Retinas from postnatal day 7 LM $\alpha 1$ knockout mice (**B**) exhibited a poor primary retinal plexus in contrast to wildtype mice that showed an organised vasculature with capillaries and small branched vessels (**A**) as visualised with *Griffonia simplicifolia isolectin* staining. Abnormal blood vessel organisation is still obvious in the adult stage as visualised by staining for ADPase showing tortuous capillaries and larger vessels extending into the vitreous (**D** versus **C**).

Table 1 Role of laminins on angiogenesis, experimental approaches and biological responses

Experimental approach	Biological response	Reference
Laminin $\alpha 1$ chain		
Purified LM-111 Collagen assay Embryoid body assay CAM assay	Tube formation Angiogenesis Angiogenesis	Dixelius <i>et al.</i> 2004
Overexpression in human cancer cells Xenografting in nude mouse	Increased tumour angiogenesis	De Arcangelis <i>et al.</i> , 2001
Peptide IKVAV Cell adhesion assay <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> Matrigel assays CAM assay Zymography	EC attachment Inhibition of tubulogenesis, inhibition of angiogenesis Angiogenesis Activation of proteolytic enzymes	Grant <i>et al.</i> 1992 and 1994 Kibbey <i>et al.</i> 1992 Stack <i>et al.</i> 1993 Faisal Khan and Falcone, 1997
Peptide A10, A13, A55, A64, A118, A119, A124, A203 Matrigel assay Aortic ring assay Boyden chamber assay	Tube inhibition Vessel sprouting Migration (A10, A55, A64)	Malinda <i>et al.</i> 1999 Kuratomi <i>et al.</i> 1999
Peptide AG73 CAM and aortic ring assay Immunoblotting	Angiogenesis, vessel sprouting Interaction with Syndecans	Mochizuki <i>et al.</i> 2007 Hoffman <i>et al.</i> 1998
RGD peptide Cell adhesion assay Matrigel assay Zebrafish with mutated Lama1	EC attachment, EC spreading Tube inhibition Delayed EC differentiation Defect in hyaloid vasculature	Aumailley <i>et al.</i> 1991 Grant <i>et al.</i> 1989 Semina <i>et al.</i> 2006
Mouse with mutated Lama1, and mouse with conditional Lama1 knockout	Defect in vessel formation, Defect in hyaloid vasculature, Impaired angiogenesis	Edwards <i>et al.</i> 2010
Laminin $\beta 1$ chain		
Peptide B7, B49, B77, B97, B160, Matrigel assay Aortic ring assay Boyden chamber assay	Tube inhibition Vessel sprouting Migration (B160)	Malinda <i>et al.</i> 1999
Peptide YIGSR Matrigel assay CAM assay	Tube inhibition Inhibition of angiogenesis	Kubota <i>et al.</i> 1988, Grant <i>et al.</i> 1989 Sakamoto <i>et al.</i> 1991
Laminin $\gamma 1$ chain		
Peptide C16, C25, C30, C38, C64, C75, C102 Matrigel assay Cell adhesion and aortic ring assay CAM assay	Tube inhibition EC attachment, vessel sprouting Angiogenesis (C25, C30, C38, C64)	Ponce <i>et al.</i> 1999
Laminin $\alpha 4$ chain		
Blocking antibodies and recombinant protein Cell adhesion assay Matrigel assay <i>In vivo</i> Matrigel assay	EC adhesion, EC migration, Tube inhibition Stimulation angiogenesis	Gonzales <i>et al.</i> 2001 Gonzalez <i>et al.</i> 2002
Overexpression in EC Scratch wound assay Collagen assay	EC spreading, EC migration Tube formation	Li <i>et al.</i> 2006
Blocking antibodies Proliferation assay TUNEL assay Knockout mouse	Inhibition of proliferation Enhanced apoptosis Impaired microvessel maturation	DeHahn <i>et al.</i> 2004 Thyboll <i>et al.</i> 2002
Xenografting of cancer cells into Lama4 knockout mouse	Increased tumor angiogenesis	Zhou <i>et al.</i> 2004
Laminin $\alpha 5$ chain		
Knockout mouse	Reduced vessel stability	Miner <i>et al.</i> 1998; Miner, 2008
Recombinant LM-511 Cell adhesion assay Migration assay	EC attachment EC migration	Doi <i>et al.</i> 2002
Purified LM-511/521 Embryoid body assay	No effect	Dixelius <i>et al.</i> 2004

Effects of LM chains on angiogenesis are summarised. Experimental approaches and biological responses of EC such as adhesion, migration and tube formation are presented for each LM as either the full length molecule or specific peptides. Standard procedures such as Boyden chamber assay, CAM assay, aortic ring assay, embryoid body assay, scratch wound assay, collagen assay, TUNEL assay (Cimpean *et al.* 2010) as well as overexpression and gene ablation were applied to investigate the effect of the various LM on angiogenesis. Note that multiple peptide competed responses of cells toward LM-111 within Matrigel.

Résumé

La laminine-511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$), élément de la matrice extracellulaire, fait partie des molécules médiatrices des interactions épithélio-mésenchymateuses qui contrôlent le développement intestinal puis le renouvellement cellulaire dans l'organe mature. Une rupture de l'homéostasie de l'ensemble de ces mécanismes est centrale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) qui, dans une certaine proportion, peuvent dégénérer en cancer colorectal. Ce travail de thèse a permis de démontrer que la chaîne $\alpha 5$ de laminine, caractéristique de la laminine-511, pouvait d'une part réguler l'expression de gènes cibles importants dans les fonctions biologiques majeures des cellules intestinales et d'autre part était capable de réprimer ou d'activer deux voies de signalisation, Wnt et PI3K/Akt, suivant le contexte physiologique. Dans le contexte pathologique particulier des MICI, j'ai pu définir la composition en laminines de la lame basale dans des segments pathologiques issus d'exérèses chirurgicales de côlons de patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique. De façon très intéressante, des glandes atypiques y ont été trouvées, délimitées par une lame basale enrichie en chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ de laminines et caractérisées par une accumulation nucléaire de la protéine p53, suppresseur de tumeur. J'ai pu définir, par des expériences *in vitro*, une chronologie d'activation montrant que la protéine p53 était capable de stimuler l'expression endogène de la chaîne $\alpha 1$ de laminine. J'ai également pu modéliser les résultats obtenus chez l'humain par des inductions chimiques d'inflammation et de tumorigenèse associée grâce à des modèles de souris transgéniques sur-exprimant soit la chaîne $\alpha 1$ soit la chaîne $\alpha 5$ dans l'épithélium intestinal, modèles établis par l'équipe. Les dérégulations des laminines qui ont été observées peuvent jouer un rôle important dans la rupture de l'épithélium, l'inflammation et les mécanismes de réparation qui leur sont inhérents ou dans la progression des MICI en cancer.

Summary

The laminin-511 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$), key element of the extracellular matrix, mediates the epithelial-mesenchymal interactions controlling the intestinal development and the cell renewal in the mature organ. A deregulation of the mechanisms implied in the homeostasis is obvious in inflammatory bowel diseases (IBD). IBD can in some cases degenerate into colorectal cancer. My present work demonstrates that the $\alpha 5$ chain, characteristic of the laminin-511 molecule, regulates the expression of target genes important for major biological functions of the intestinal cells as well as is able to repress or activate two signaling pathways, Wnt and PI3K/Akt, according to the physiological context. In the particular context of IBD, I could define the laminin composition of the basement membrane in pathological samples from surgical resection of colon from patients with Crohn's disease or Ulcerative colitis. Interestingly, atypical glands are also found in these samples. These glands are encircled with a basement membrane enriched in laminin $\alpha 1$ and $\alpha 5$ chains and are characterized by a nuclear accumulation of p53, a tumor suppressor. By *in vitro* experiments, I have defined a chronology of activation showing that the p53 protein is able to stimulate the endogenous expression of the laminin $\alpha 1$ chain. I could mimic the results obtained in humans by triggering inflammation and inflammation-associated tumorigenesis chemically to transgenic murine models overexpressing either the laminin $\alpha 1$ or $\alpha 5$ chain, models that were previously established in the team. The laminin-observed deregulations could play an important role in the epithelium rupture, the inflammation and the inherent repair mechanisms, as well as in the progression of IBD into cancer.