



HAL
open science

Fonction de la chymotrypsine dans l'homéostasie de la barrière intestinale

Simon Guignard

► **To cite this version:**

Simon Guignard. Fonction de la chymotrypsine dans l'homéostasie de la barrière intestinale. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30293 . tel-04643351

HAL Id: tel-04643351

<https://theses.hal.science/tel-04643351v1>

Submitted on 10 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Simon GUIGNARD

Le 23 octobre 2023

**Fonction de la chymotrypsine dans l'homéostasie de la barrière
intestinale**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :
IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive

Thèse dirigée par
Céline DERAISON et Chrystelle BONNART

Jury

M. Ralf JOCKERS, Rapporteur
M. Alain COUVINEAU, Rapporteur
M. Philippe JAY, Rapporteur
Mme Maude LE GALL, Examinatrice
M. Nicolas CENAC, Examineur
Mme Céline DERAISON, Directrice de thèse
Mme Chrystelle BONNART, Co-directrice de thèse

*“Expliquer toute la nature est une tâche trop ardue pour un seul homme ou une seule époque.
Il est plus sage de faire peu en étant sûr de soi et laisser le reste à ceux qui viendront après,
que présumer de tout sans être sûr de rien.”*

Isaac Newton

Remerciements

Avant de commencer tout développement, il m'apparaît essentiel de rappeler que les travaux présentés dans ce manuscrit, comme tout travail de recherche d'ailleurs, sont le fruit d'un travail collectif de toute une équipe. Il s'agit probablement d'une des grandes leçons apprises au cours de ces quatre années de thèse et ce chapitre est donc pour moi l'occasion d'adresser ma plus profonde gratitude à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce projet.

En premier lieu, je suis très reconnaissant envers l'**INRAE** et la **Fondation pour la Recherche Médicale** d'avoir financé une partie de mon projet de thèse.

Je souhaiterai ensuite remercier les docteurs **Philippe Jay**, **Alain Couvineau** et **Ralf Jockers** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que le docteur **Maud Le Gall** d'être intervenue en tant qu'examinatrice. Je vous remercie infiniment d'avoir accepté d'évaluer mes travaux, d'y avoir consacré du temps et pour les échanges constructifs et bienveillants que nous avons pu avoir à cette occasion. Merci également au Dr. **Nicolas Cenac** d'avoir présidé ce jury, j'ai beaucoup apprécié ta curiosité scientifique et la sympathie dont tu as fait preuve à mon égard au cours de ces années passées au sein de l'institut.

Par ces mots, je souhaite aussi exprimer ma plus grande gratitude envers mes directrices de thèse. Si l'on m'avait demandé à quoi pourrait ressembler ma relation avec mes directrices avant de commencer ma thèse, j'aurais sans doute souhaité qu'elle ressemble à celle que nous avons développé au cours de quatre ans : saine, bienveillante et exigeante. **Christelle**, il y a maintenant quatre ans tu as pris le risque d'accueillir un étudiant venu d'une contrée lointaine, dont tu ne connaissais pas grand-chose et ce pour ton premier encadrement de thèse. Je te remercie infiniment pour la confiance que tu m'as accordée et j'espère en avoir été digne. Grâce à toi, je me suis senti comme chez moi au sein de cette équipe et j'ai énormément appris à tes côtés. D'un point de vue scientifique d'abord, où ta GRANDE rigueur et ton sens aigu du détail m'ont fait considérablement progresser. Je garderai en mémoire nos longues heures passées en dissection à essayer d'éviter les projections de lavages intestinaux ou à passer en revue notre article jusqu'à la moindre ponctuation... elle nous aura fait suer cette foutue chymo mais ça en valait la peine ! Au quotidien, ta patience et ton soutien sans

faillie ont été d'une aide inestimable et tu m'as montré que l'on pouvait faire de la recherche tout en conservant de grandes qualités humaines qui sont, selon moi, trop souvent négligées dans ce milieu. J'espère que nous resterons en contact et que nos chemins se recroiseront un de ces quatre !

Céline, un grand merci à toi aussi ! Au fil des mois passés au laboratoire j'ai appris à découvrir le grand cœur et l'amatrice de Gin to' qui se cachait derrière ta posture parfois intransigeante et ton accent anglais vraiment... très bon. Même si tu dis souvent que tu n'as pas joué un grand rôle dans mon encadrement de thèse, je trouve pour ma part que tu as toujours su te rendre disponible pour me partager tes conseils lorsque j'en avais besoin malgré ton agenda bien chargé et les multiples rôles que tu endosses dans cette équipe. Ton soutien, en particulier lors de ces derniers mois, et ta positivité à l'égard de mon travail ont été précieux pour un éternel insatisfait comme moi. Je te souhaite le meilleur pour la suite et si ça peut te rassurer Victor Hugo disait "*Quarante ans, c'est la vieillesse de la jeunesse, mais cinquante ans, c'est la jeunesse de la vieillesse* », alors j'espère qu'on aura encore l'occasion de faire la tournée des bars de Banff et de travailler ensemble.

Je remercie aussi la Dr. **Nathalie Vergnolle** de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de son institut. A mon arrivée au labo je dois dire que j'étais assez intimidé par ton parcours, mais ton naturel et ton accessibilité m'ont immédiatement mis à l'aise. Toi aussi tu as toujours su trouver le temps d'échanger avec nous sur la conduite du projet et nous partager ton expérience de la recherche. Cela fut très inspirant de côtoyer des chercheurs de ton niveau. J'ai beaucoup apprécié nos discussions ouvertes et sans tabou concernant mon avenir. Pour tout cela, je tiens à te remercier.

Un immense merci également à **tous les membres de l'équipe 1** qui ont su m'accueillir comme l'un des leurs dès mon arrivée et au sein de laquelle je me suis pleinement épanoui. Vous allez tous beaucoup me manquer.

Aux chercheurs de l'équipe, **Jean-Paul, Agnès, Mireille et Claire...** Par vos conseils, votre expertise et votre esprit critique vous avez tous participé à ma progression et à la bonne conduite de ce projet, merci mille fois.

Comment ne pas citer aussi les membres du bureau où tout a débuté, renommé « bureau des filles » depuis mon départ. Une semaine sans friandise dans ce bureau et c'est

la productivité de toute une équipe qui plonge... Soyez sans crainte, j'exhorterai les cheffes d'équipes à continuer de vous nourrir ad libitum.

Corinne ou plutôt « Super Coco », toujours prête à secourir une manip en passe d'échouer. Ton implication totale et ta polyvalence technique forcent le respect. Tu es incontestablement le pilier de cette équipe et je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, c'est-à-dire à peu près tout ce que je sais faire d'un point de vue technique. Je te confie à présent le Novostar, fais-en bon usage.

Merci à vous deux **Anissa** et **Laura**, les supers mamans du bureau, pour votre aide précieuse au labo et en dehors. Toujours prêtes à donner un coup de main, le moins que l'on puisse dire c'est que peu de projets avanceraient sans vous. Ce fut un réel plaisir de vous côtoyer car votre gentillesse et votre sérénité font beaucoup de bien au quotidien. Je vous confie Coco, prenez-en soin.

Un grand merci aux deux **Mélissa(s), le D** d'abord, tu es le parfait exemple que les gens les plus humbles et discrets sont souvent les plus compétents, je te remercie beaucoup pour ton soutien. Garde ton enthousiasme et ta curiosité, ils risquent de déteindre sur les gens qui t'entourent. **Le P**, pour une normande tu es remarquablement civilisée et malgré le fait que tu sois l'une des dernières arrivantes, tu as déjà réussi à te faire une place dans l'équipe. J'ai beaucoup apprécié les moments partagés avec toi et nos moments de rigolade, même si, souvent, tu n'as besoin de personne pour te faire rire.

Ma **Juju**, il ne nous aura pas fallu très longtemps pour nous apprivoiser, probablement guidés par une passion commune pour la bouffe et les blagues nulles. Merci de m'avoir supporté pendant toutes ces pauses clopes à refaire le monde, ces BK, ces binouses... et ces vanes pourries dont tu étais souvent la cible (j'espère que tu me pardonneras un jour). Tu es une belle personne avec un grand cœur et je suis heureux d'avoir croisé ta route. Tu vas me manquer mais je sais que je te laisse bien entourée, Seiko et Elliot seront là pour te surveiller et puis maintenant que tu es presque fonctionnaire tu n'as plus vraiment besoin de travailler de toute façon...

Nous avons souvent dû faire preuve de solidarité masculine parmi toutes ces filles, alors merci à toi aussi mon **David**. Tu as grandement facilité mon intégration au labo et, même si tu as préféré t'exiler au 1^{er} étage depuis peu, quel plaisir de t'avoir rencontré, mon pote !

Hormis la vodka-violette, je suis infiniment reconnaissant de tout le savoir que tu as partagé avec moi, de la manipulation de l'Opéra à la culture d'organoïdes, dont tu m'as tout appris.

Je remercie aussi chaleureusement les autres « jeunes » de l'équipe pour leur bonne humeur et leur enthousiasme : **Alexia, Guillaume, Marion**, les deux **Romain** et **Jin. Alex** (la moins jeune du bureau des jeunes), merci beaucoup pour ton écoute, tes conseils et ton temps passé à relire ma thèse. Ne te fais pas trop de soucis pour la suite, si tu ne deviens pas prix Nobel, on ira élever des chèvres ensemble dans le Larzac.

Je ressens également une profonde reconnaissance envers toutes les belles rencontres que j'ai pu faire au sein de cet institut. Merci aux anciens : **Prunelle, Kévin, Jorge, Mégane, Anaïs, Dimitri, Camille**, dont je vais maintenant faire partie. On en aura vécu des soirées, des week-ends et des borriquito ensemble et je ne compte pas m'arrêter là ! Merci à toi **Mathieu**, ton espièglerie n'a d'égale que ta sympathie. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse, même si je ne me fais pas trop de soucis pour toi... En revanche, je m'inquiète un peu plus pour **Chloé** et **Céline B**, qui vont devoir subir tes maltraitances encore quelques temps... Merci aussi à vous deux. À **Elodie**, qui, même en changeant d'équipe, est toujours restée aussi gentille et avenante. Merci à **Ombline** de t'être impliquée dans mon projet au cours de ton stage. J'espère t'avoir donné une bonne image de la recherche et je suis sûr que tu feras une bonne vétérinaire.

Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel des plateformes technologiques et services communs qui m'ont apporté leur aide, directement ou indirectement, tout au long de ma thèse (organoïdes, zootechnie, imagerie, histopathologie, laverie...). Un mot également pour toutes les personnes avec qui j'ai eu le privilège de collaborer. **Sandrine Ménard** notamment, la reine des chambres de Ussing, merci pour ta patience et ta gentillesse. Merci au Dr. **Nicolas Gatimel** de m'avoir fait confiance pour le projet CatSPer, ainsi qu'à **Laurie**. Grâce à vous j'ai pu me plonger dans un domaine scientifique bien différent du mien, mais tout aussi passionnant. Finally, thank you to **Morley Hollenberg** for sharing your expertise with us in the field of PARs. I feel fortunate to have had the opportunity to work with you and your team, hoping that our paths will cross again someday.

Un grand merci aussi aux Dr. **Valérie Amarger** et **Morgane Frapin**, qui m'ont toutes les deux initié à la recherche et encadré pendant mes stages de Master. J'ai adoré travailler avec

vous et les solides bases que vous m'avez transmises m'ont sans aucun doute grandement facilité la tâche lors mes expériences ultérieures.

Et puis, parce qu'il y a une vie en dehors du laboratoire, je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée particulière pour mes amis qui restent à distance de ce monde de fou. Merci à mes deux acolytes de toujours, **Clem** et **Andy**. Cela fait maintenant quelques années qu'on se suit depuis ce nouvel an mémorable à Barcelone et je crois que ça va encore continuer ! Je dois avouer que j'éprouve une certaine peur à l'idée qu'on vous confie parfois la vie d'innocents entre les mains, mais je resterai toutefois le premier fan de votre humour de merde et admiratif de vos parcours respectifs. Merci à l'équipe de la Romeufontaine : **Clémence** (future barwoman ambulante), **Caro** (la bougn'), **Amandine** (aka amadine), **Audren** (ultra-drendren) et **Uby** (super ronron), vous ne savez pas à quel point cette soirée d'été passée à vos côtés, au bord de la piscine, m'a fait du bien. Une grosse pensée aussi à mes copains nantais, avec qui j'ai passé mes plus belles années à la FAC : **Antoine, Thomas, Arsène, Flavien, Sam, Théo, Enora, Constance, Kelly, Océane**. Je suis fier de ce que vous êtes tous devenus et j'ai hâte de vous retrouver pour de nouvelles soirées parapentes, à Sainte-Brigitte où ailleurs. Merci enfin à la **team KF**, qui tout en transpirant, m'aura permis de me vider la tête durant cette dernière année tout en assouvissant ma passion première : bouger !

Un immense merci à ma famille. A mes parents d'abord, **Papa, Maman**, il serait désuet de rappeler que le peu de chemin que j'ai parcouru jusqu'ici, je l'ai parcouru grâce à vous et pour vous rendre fiers. Bien que la distance soit parfois difficile à gérer, vous m'avez toujours encouragé dans mes choix et êtes tout ce qu'on peut attendre de parents : aimants, attentifs et dévoués. Tout ce que vous avez eu dans la vie, vous l'avez arraché à force de travail et de persévérance. Je n'ai donc eu qu'à m'inspirer de votre exemple pour trouver le soupçon de motivation et d'abnégation nécessaire pour atteindre mes objectifs. Je suis fier de vous et j'espère un jour pouvoir apporter à quelqu'un autant que ce que vous avez su m'apporter. Merci à mes frères, **Thomas** et **Jérémy**. Bien que nous ne soyons pas très expansifs les uns envers les autres, je veux que vous sachiez que tout devient plus simple quand on a les bons exemples à suivre. A **Laura**, sans vouloir te molester, ta bonté et ta bonne humeur restent toujours terriblement efficaces pour nous redonner le sourire. **Pablo, Ainoa**, je suis déjà très fier de vous et j'espère ne pas avoir été un tonton trop traumatisant (Ps : arrêtez de grandir, ça devient vexant). Je vous aime tous autant que vous êtes.

Enfin, s'il n'y avait qu'une seule évidence dans cette thèse, et cela avant même que je commence à en écrire la première ligne, c'est que je conclurai la rédaction de ce manuscrit en te témoignant ma gratitude infinie, **Mélanie**. Les personnes qui liront cette thèse ne soupçonneront d'ailleurs probablement pas à quel point tu mérites ce titre de docteur autant que moi. Tu as souvent eu plus de confiance en moi que je n'ai eu en moi-même pendant ces quatre années et tu as toujours été là pour partager mes doutes, mes joies, et parfois même mes crises de nerfs. De notre rencontre en BTS à la course de la délivrance le soir où j'ai fini d'écrire cette thèse, je n'aurai, pour rien au monde, souhaité partager cette aventure avec quelqu'un d'autre que toi. Comme tu l'as dit très justement, nous avons grandi ensemble et je suis extrêmement fier de la grande grise que tu es devenue. Je t'aime fort, longue vie aux Gris.

Alors pour tout cela et bien plus encore, à tous et à chacun, merci.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Introduction bibliographique	3
Chapitre 1 : Physiologie de l'épithélium gastro-intestinal.....	6
1.1. Anatomie du système digestif et introduction à la physiologie digestive	6
a) <i>La cavité buccale</i>	<i>7</i>
b) <i>L'estomac.....</i>	<i>7</i>
c) <i>L'intestin grêle.....</i>	<i>8</i>
d) <i>Le gros intestin</i>	<i>10</i>
1.2. Histologie de la paroi gastro-intestinale	11
1.3. Physiologie de l'épithélium gastro-intestinal.....	14
1.3.1. Développement de l'épithélium intestinal	14
1.3.2. Composition cellulaire et renouvellement de l'épithélium intestinal	15
a) <i>Cellules souches intestinales actives et renouvellement épithélial</i>	<i>16</i>
b) <i>Contrôle du destin des cellules souches intestinales : rôle de la niche</i>	<i>17</i>
c) <i>Différenciation des cellules souches intestinales et zone d'amplification transitoire</i>	<i>19</i>
d) <i>Les cellules absorbatives différenciées.....</i>	<i>21</i>
e) <i>Les cellules sécrétrices différenciées</i>	<i>22</i>
f) <i>Plasticité épithéliale et réparation en conditions pathologiques.....</i>	<i>24</i>
1.4. Grandes fonctions de l'épithélium intestinal	28
1.4.1. Fonction d'absorption	28
1.4.2. Fonction de barrière.....	29
a) <i>L'épithélium : une barrière physique.....</i>	<i>29</i>
b) <i>Ségrégation du microbiote : la composante sécrétoire apicale de la barrière épithéliale intestinale</i>	<i>32</i>
1.4.3. L'épithélium intestinal : un médiateur entre les microorganismes luminaux et l'immunité de l'hôte	34
1.4.4. Fonction de sécrétion basolatérale	35
1.5. L'épithélium gastrique.....	36
a) <i>Glandes gastriques et cellules souches</i>	<i>37</i>
b) <i>Les cellules gastriques différenciées</i>	<i>38</i>
1.6. Le microbiote intestinal.....	39
1.7. Pathologies du tractus digestif : les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.....	42
1.7.1. Présentation générale et épidémiologie des MICI.....	42
1.7.2. La rectocolite hémorragique	44
1.7.3. La maladie de Crohn	46
1.7.4. Etiologie des MICI	46
a) <i>Composante génétique.....</i>	<i>47</i>
b) <i>Composante environnementale.....</i>	<i>47</i>
1.7.5. Physiopathologie des MICI.....	48
a) <i>Rôle du microbiote.....</i>	<i>48</i>
b) <i>Implication des acteurs tissulaires et moléculaires de l'hôte</i>	<i>50</i>

1.7.6.	Thérapeutiques des MICI	52
1.8.	Modèles d'étude <i>in vitro</i> de l'épithélium intestinal	53
1.8.1.	Culture de lignées épithéliales en deux dimensions	53
1.8.2.	Culture de cellules primaires épithéliales en trois dimensions	54
Chapitre 2 : signalisation protéolytique dans l'intestin		58
2.1.	Classification et mécanismes d'action des enzymes protéolytiques	59
2.1.1.	La catalyse covalente : les protéases à sérine, cystéine et thréonine	60
a)	<i>Gros plan sur les protéases à sérine</i>	62
b)	<i>Les protéases à cystéine</i>	63
2.1.2.	La catalyse par des ions métalliques : cas des métalloprotéases	63
2.1.3.	La catalyse acide-base : les protéases à aspartate.....	64
2.2.	Mécanismes de régulation des protéases.....	64
a)	<i>Les serpinines</i>	65
b)	<i>Les chélonianines</i>	66
c)	<i>Les inhibiteurs de type Kazal</i>	67
2.3.	Les Récepteurs Activés par les Protéases (PARs) : les protéases comme molécules de signalisation cellulaire	68
2.3.1.	Découverte des PARs	68
2.3.2.	Structure génétique et protéique.....	70
2.3.3.	Mécanismes d'activation des récepteurs PARs.....	72
a)	<i>Mécanisme d'activation canonique des PARs</i>	72
b)	<i>Activation biaisée des PARs</i>	74
c)	<i>Désarmage des PARs</i>	74
d)	<i>Activation par des agonistes synthétiques</i>	76
2.3.4.	Transduction du signal	77
a)	<i>Introduction à la signalisation des RCPG</i>	77
b)	<i>Voies de signalisation des PARs dépendantes des protéines G</i>	78
c)	<i>Terminaison du signal</i>	80
d)	<i>Signalisation indépendante des protéines G</i>	82
2.3.5.	Interactions des PARs avec d'autres récepteurs.....	82
a)	<i>Les PARs comme cofacteurs</i>	82
b)	<i>Transactivation d'autres récepteurs par les PARs</i>	84
2.3.6.	Expression intestinale des PARs	84
2.4.	Implication des protéases et de leurs récepteurs dans la physiologie de l'épithélium intestinal	86
2.4.1.	Maturation de protéines bioactives	86
2.4.2.	Régulation des sécrétions épithéliales et du transport des ions	87
a)	<i>Sécrétion de prostaglandines</i>	87
b)	<i>Transport des ions</i>	87
c)	<i>Production de mucus</i>	87
2.4.3.	Régulation de la perméabilité	87
2.4.4.	Renouvellement épithélial et apoptose	88
2.4.5.	Régulation du microbiote.....	89
2.5.	Dérégulation de la balance protéolytique lors des MICI	90
2.5.1.	Origine des protéases impliquées dans la physiopathologie des MICI	90
a)	<i>Protéases intracellulaires</i>	90
b)	<i>Protéases produites par le système immunitaire</i>	91
c)	<i>Protéases microbiennes</i>	91
d)	<i>Protéases sécrétées par l'épithélium intestinal</i>	92

2.5.2.	Rôles des protéases dans la physiopathologie des MICI	93
a)	Régulation de la réponse inflammatoire par les protéases	93
b)	Implication des PARs dans l'inflammation intestinale	94
c)	Protéases et perturbation de la barrière épithéliale dans les MICI	95
d)	Protéases et douleur viscérale	96
Chapitre 3 : la chymotrypsine, une simple protéase digestive ?.....		98
3.1.	Introduction aux protéases pancréatiques	98
3.2.	Les chymotrypsines : découverte et relation structure-activité	100
3.2.1.	Structure du chymotrypsinogène et mécanisme d'activation.....	100
3.2.2.	Description des différentes formes de chymotrypsine	103
a)	La chymotrypsine B.....	103
b)	La chymotrypsine C (CTRC).....	104
c)	La « chymotrypsin-like protease » (CTRL)	104
3.3.	Régulation de l'activité de la chymotrypsine dans le tractus digestif.....	105
3.4.	La chymotrypsine : une enzyme essentiellement pancréatique ?	106
3.5.	Implications extra-digestives de la chymotrypsine	107
3.5.1.	Fonctions extra-digestives de la chymotrypsine endogène	107
a)	Protection contre la pancréatite : contrôle de l'activité du trypsinogène	107
b)	Implication de la chymotrypsine dans la régulation de la perméabilité intestinale.....	108
3.5.2.	Apports exogènes de chymotrypsine : une protéase anti-inflammatoire ?	108
Hypothèse générale et objectifs du projet de thèse		110
Matériels et méthodes		113
Résultats expérimentaux		127
Partie 1 : Étude pharmacologique de l'interaction entre la chymotrypsine et les récepteurs PARs		128
Résultats complémentaires : interaction de la chymotrypsine avec les récepteurs PAR3 et PAR4.....		177
Introduction		177
Résultats.....		178
Caractérisation du clivage de PAR3 et PAR4 par la chymotrypsine		178
Etude de la signalisation de la chymotrypsine en aval de PAR3		180
Conclusion.....		183
Partie 2 : Caractérisation des effets biologiques de la chymotrypsine sur l'épithélium intestinal		185
Introduction		185
Résultats		186
La chymotrypsine n'impacte pas la croissance et la morphologie des organoïdes intestinaux humains		186
La chymotrypsine modifie l'expression de gènes clés pour le maintien des fonctions épithéliales .		188
Etude de l'implication de PAR2 dans les effets transcriptionnels de la chymotrypsine		191
Discussion et conclusion.....		194
Figures supplémentaires		198
Partie 3 : Régulation de l'activité chymotrypsique fécale chez les patients atteints de MICI		200

Introduction.....	200
Résultats	201
L'activité chymotrypsique fécale est augmentée chez les patients atteints de MICI	201
Discussion et conclusion.....	204
Partie 4 : étude exploratoire d'une expression de la chymotrypsine par la muqueuse gastro-intestinale	207
Introduction.....	207
Résultats	208
L'ARNm de la chymotrypsine B est exprimé par l'épithélium intestinal murin et sa protéine est retrouvée ponctuellement dans des cellules épithéliales de l'intestin grêle	208
L'expression intestinale de la CTRB n'est pas retrouvée chez l'Homme	212
La chymotrypsine B est détectée dans l'épithélium gastrique murin et humain	214
L'ARNm de la chymotrypsin-like protease (CTRL) est détecté dans la muqueuse intestinale chez l'Homme.....	218
Discussion et conclusion.....	220
Figures supplémentaires	223
Discussion générale.....	226
1. Quels rôles extra-digestifs pour la chymotrypsine dans l'intestin ?.....	227
2. La chymotrypsine, un nouvel acteur de la signalisation protéolytique dans l'intestin ?	231
3. L'exploration <i>in vivo</i> pour mieux caractériser la fonction physiologique de la chymotrypsine ...	237
4. La chymotrypsine, une nouvelle protéase épithéliale ?.....	238
5. Implications de l'activité chymotrypsique dans la physiopathologie des MICI ?.....	240
Conclusion générale	244
Annexes.....	247
Références bibliographiques	277
Abstract	308

Index des figures et tableaux

Liste des figures :

Figure 1: représentation schématique du système digestif humain.....	7
Figure 2: représentation schématique de l'estomac humain.....	8
Figure 3: anatomie de l'intestin grêle et du colon humains.....	10
Figure 4: représentation schématique des tuniques histologiques du tube digestif.....	11
Figure 5: développement embryonnaire de l'épithélium intestinal.....	15
Figure 6: architecture de l'épithélium dans l'intestin grêle et le colon.....	16
Figure 7: renouvellement et différenciation des cellules souches intestinales.....	18
Figure 8: différenciation des cellules souches intestinales.....	20
Figure 9: mécanismes potentiels de réparation épithéliale en condition pathologique.....	25
Figure 10: voie de passage paracellulaire et transcellulaire et organisation des jonctions cellulaires de la barrière épithéliale intestinale.....	31
Figure 11: les acteurs sécrétés de la barrière épithéliale intestinale.....	33
Figure 12: architecture et composition cellulaire de l'épithélium gastrique.....	37
Figure 13: composition du microbiote le long du tractus digestif.....	40
Figure 14: classification de l'incidence des MICI à travers le globe, proposée par Kaplan et Windsor, 2021.	43
Figure 15: caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des MICI.	45
Figure 16: mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la muqueuse intestinale lors des MICI.....	49
Figure 17: modèle de culture d'organoïdes intestinaux.....	55
Figure 18: réaction générale d'hydrolyse des liaisons peptidiques par les protéases.....	58
Figure 19: représentation schématique des interactions entre une protéase et son substrat protéique.....	59
Figure 20: mécanisme de catalyse covalente utilisé par la chymotrypsine.....	61
Figure 21: représentation schématique des poches catalytiques des protéases à sérine de types trypsine, chymotrypsine et élastase.....	62
Figure 22: représentation schématique de l'histoire de la découverte des PARs.....	69
Figure 23: structure protéique des Récepteurs Activés par les Protéases (PARs) humains et mécanisme d'activation canonique.....	71
Figure 24: mécanismes d'activation et de désarmage des PARs par les protéases.....	75
Figure 25: schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par les PARs.....	79
Figure 26: mécanisme général de désensibilisation et d'internalisation des RCPG.....	80
Figure 27: représentation schématique des mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des PARs.....	81
Figure 28: co-activation de PAR3 et PAR4.....	83
Figure 29: expression des PARs à la surface des cellules intestinales.....	85

<i>Figure 30: vue d'ensemble des fonctions de l'épithélium intestinal régulées par les protéases.</i>	89
<i>Figure 31: vue d'ensemble de la régulation des protéases en condition physiologique et de leurs implications dans la physiopathologie des MICI.</i>	93
<i>Figure 32: anatomie et organisation tissulaire du pancréas.</i>	99
<i>Figure 33: abondance relative des protéases au sein des sucs pancréatiques humains.</i>	99
<i>Figure 34: mécanisme d'activation du chymotrypsinogène par la trypsine.</i>	102
<i>Figure 35: images représentatives des cellules immuno-positives à la CTRB dans l'épithélium gastrique et intestinal telles que rapportées par Wang et al. en 1998 chez le rat.</i>	107
<i>Figure 36: représentation schématique du plan sélectionné pour l'analyse du suivi morphologique des organoïdes.</i>	120
<i>Figure 37: la chymotrypsine clive PAR3.</i>	179
<i>Figure 38: la chymotrypsine n'active pas la voie de signalisation ERK1/2 en aval de PAR3.</i>	181
<i>Figure 39: la chymotrypsine n'active pas de signalisation calcique dans des neurones sensitifs murins, exprimant fortement PAR3.</i>	182
<i>Figure 40: schéma récapitulatif de l'étude des interactions entre la chymotrypsine et les PARs.</i>	184
<i>Figure 41: la chymotrypsine n'impacte pas la morphologie des organoïdes en culture.</i>	187
<i>Figure 42: la chymotrypsine modifie le profil d'expression génique des organoïdes.</i>	189
<i>Figure 43: PAR2 semble impliqué dans la surexpression de l'IL10 en réponse à la chymotrypsine.</i>	193
<i>Figure 44: schéma récapitulatif des résultats de la caractérisation des effets biologiques de la chymotrypsine sur les organoïdes intestinaux humains.</i>	197
<i>Figure 45: l'activité chymotrypsique fécale est augmentée lors des phases inflammatoires des MICI.</i>	203
<i>Figure 46: l'activité chymotrypsique fécale n'est pas significativement corrélée avec les marqueurs d'activité clinique des MICI.</i>	203
<i>Figure 47: représentation schématique des résultats de l'étude de l'activité chymotrypsique fécale dans les MICI.</i>	206
<i>Figure 48: le transcrit de la CTRB est exprimé par l'épithélium intestinal chez la souris.</i>	209
<i>Figure 49: la CTRB est détectée de manière très ponctuelle dans des cellules épithéliales de l'intestin grêle chez la souris.</i>	211
<i>Figure 50: la CTRB n'est pas détectée dans le colon chez la souris.</i>	212
<i>Figure 51: la CTRB n'est pas exprimée par la muqueuse intestinale ou colique humaine.</i>	214
<i>Figure 52: la CTRB est exprimée par les cellules principales de l'épithélium gastrique murin.</i>	216
<i>Figure 53: la CTRB est exprimée par l'épithélium gastrique humain.</i>	217
<i>Figure 54: la chymotrypsin-like protease (CTRL) pourrait être exprimée par l'épithélium intestinal humain.</i>	219
<i>Figure 55: représentation schématique des résultats de l'étude de l'expression de la chymotrypsine par la muqueuse gastro-intestinale.</i>	222

Liste des tableaux :

<i>Tableau 1: description des principales serpines humaines et fonctions associées.</i>	66
<i>Tableau 2: sites de clivage canoniques des PARs et ligands activateurs endogènes.</i>	71
<i>Tableau 3: principales protéases clivant les PARs, site de clivage et signalisation associée.</i>	73
<i>Tableau 4: comparaison des formes de chymotrypsine chez l'Homme et la souris.</i>	104
<i>Tableau 5: Composition du milieu de culture des organoïdes</i>	118
<i>Tableau 6: composition du milieu utilisé pour la culture des cellules mICcl2.</i>	121
<i>Tableau 7: séquences des amorces utilisées en PCR ou qPCR.</i>	122
<i>Tableau 8: données cliniques des patients composant la cohorte de selles humaines.</i>	201
<i>Tableau 9: fréquence de la détection de l'ARNm CTB1 au sein des échantillons intestinaux humains analysés.</i>	213

Liste des abréviations

2

2D : Deux dimensions

3

3D : Trois dimensions

A

ACP : Analyse en Composante Principale

AGCC : Acide Gras à Chaîne Courte

AMC : AminoMéthyl Coumarine

AMPc : AMP cyclique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BCHE : Cellules "BEST4, CFTR High-Expressor"

BMP : Bone Morphogenetic Proteins

C

CBC : Crypt Base Columnar cells

CHGA : Chromogranine A

CHO : Chinese Hamster Ovary

CRACs : Calcium Release-Activated Calcium Channels

CRP : Protéine C Réactive

CSI : Cellules Souches Intestinales

CST : Chymostatine

CTRB : Chymotrypsine B

CTRC : Chymotrypsine C

CTRL : Chymotrypsin-like protease

D

DAG : Diacylglycérol

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCS : Deep Crypt Secretory cells

DRG : Dorsal Root Ganglion

DTT : Dithiothréitol

E

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

ECL : Extracellular Loop

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

EGF : Epidermal Growth Factor

ELA2A : Elastase 2A

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases

F

Fmax : Fluorescence maximale normalisée

G

GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue

GDP : Guanosine DiPhosphate

GLP1 : Glucagon-Like Peptide-1

GRK : G protein-coupled Receptor Kinase

GTP : Guanosine TriPhosphate

GWAS : Genome-Wide Association Studies

I

ICL : Intracellular Loop

IF : Immunofluorescence

IFN : Interféron

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IP₃ : Inositol TriPhosphate

iPSC : Cellules Souches Pluripotentes induites

J

JAM : Molécules d'Adhésion Jonctionnelles

K

KCl : Chlorure de potassium
KNRK : Kirsten Murine Sarcoma Virus transformed rat kidney epithelial cells

L

Lgr5 : Leucine-Rich Repeat-containing G-protein coupled receptor 5

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MC : Maladie de Crohn
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MMP : MétalloProtéases Matricielles
MUC2 : Mucine 2

N

NLR : NOD-like récepteurs
nLuc : NanoLuciférase

P

PAMP : « Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes »
PARs : Protease-Activated Receptor
pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline (Tampon phosphate salin)
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKA : Protéine Kinase AMPC dépendante
PKC : Protéine Kinase C
PLC : PhosphoLipase C
PRR : Pattern Recognition Receptors
PSTI : Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor

R

RCH : Rectocolite hémorragique
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RE : Réticulum Endoplasmique
RFU : Unité Relative de Fluorescence
RLR : RIG-Like Récepteurs

S

Ser : sérine
slgA : Immunoglobulines A sécrétoires
slgM : Immunoglobulines M sécrétoires
SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
SLC : Solute Carrier
SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TA : Transit Amplifying zone
TFF3 : Trefoil factor 3
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
Th : Lymphocytes T "helper"
TL : Tethered Ligand
TLR : Toll-Like Récepteurs
TM : Transmembrane Domain
TNBS : Acide trinitrobenzène sulfonique
TNF α : Facteur de Nécrose Tumorale α

W

WB : Western-Blot
WENR : WNT, EGF, Noggin and R-Spondin medium

Z

ZO : Zonula Occludens

Introduction

bibliographique

Préambule :

Le projet décrit dans ce manuscrit s'est attaché à étudier les caractéristiques de la chymotrypsine, une protéase clé de la digestion, et ses potentielles interactions avec la muqueuse digestive. Pour introduire ces travaux, un premier chapitre sera dédié à une brève présentation de l'anatomie du système digestif, suivie d'une description de l'épithélium intestinal en condition physiologique, ainsi que de ses altérations en conditions pathologiques inflammatoires. Ces propos préliminaires seront poursuivis en illustrant le rôle des protéases et de leur signalisation dans l'homéostasie intestinale, avant d'aborder l'objet d'étude de ce projet : la chymotrypsine.

Chapitre 1 : Physiologie de l'épithélium gastro-intestinal

1.1. Anatomie du système digestif et introduction à la physiologie digestive

Le propre des êtres vivants est d'avoir développé des mécanismes d'adaptation aux contraintes de leur environnement, leur permettant d'assurer la pérennité de leur métabolisme énergétique. Au sein du règne animal, la satisfaction des besoins énergétiques et plastiques passe par l'assimilation de molécules organiques et inorganiques parfois complexes. Ce processus nécessite des étapes successives d'ingestion, de fractionnement des aliments en nutriments (digestion), de passage des nutriments vers le milieu intérieur (absorption) et enfin d'élimination de la fraction indigeste de l'ingesta. Ces étapes sont assurées par un ensemble d'organes fonctionnant en synergie et formant le système digestif (Figure 1). Ce système est composé du tube digestif (regroupant cavité buccale, oropharynx, œsophage, estomac, intestin grêle, colon, rectum et anus) et de glandes annexes (glandes salivaires, foie, pancréas et vésicule biliaire).

Long d'une dizaine de mètres chez l'Homme, le tube digestif représente l'une des plus grandes surfaces d'échange de l'organisme avec l'environnement extérieur. Il se divise en régions distinctes d'un point de vue anatomique et fonctionnel. On peut ainsi distinguer le tractus gastro-intestinal supérieur (comprenant la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et l'ensemble de l'intestin grêle), du tractus inférieur (colon, rectum, anus). Au sein du tube digestif, la digestion des aliments est accomplie par des procédés mécaniques et chimiques assurant leur solubilisation puis leur fragmentation de sorte qu'ils atteignent une taille suffisamment petite et des propriétés physico-chimiques en adéquation avec leur absorption.

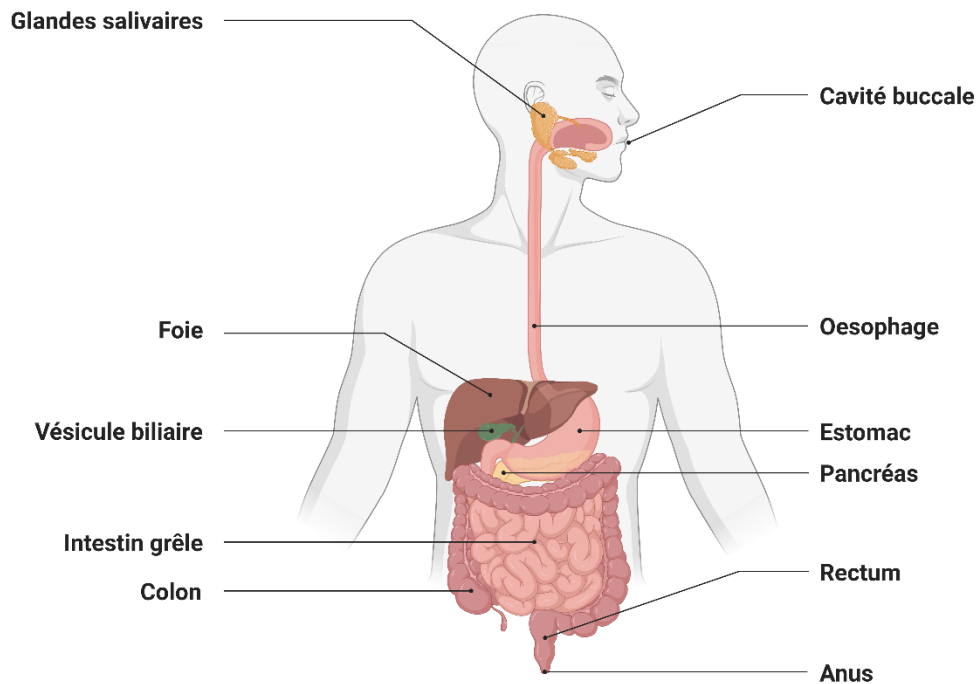


Figure 1: représentation schématique du système digestif humain.

Figure créée avec BioRender.com.

a) La cavité buccale

La digestion des aliments commence dès la cavité buccale où ils sont broyés par mastication et mélangés aux produits de sécrétions des glandes salivaires contenant des lipases et amylases qui initient la dégradation des lipides et glucides. Les sécrétions aqueuses des glandes salivaires contiennent également des mucines qui serviront à lubrifier le passage du bol alimentaire dans la suite du tube digestif.

b) L'estomac

Après ingestion et passage par la cavité buccale et œsophagienne, le contenu alimentaire poursuit sa route vers l'estomac. Chez l'Homme, cet organe peut être décomposé en quatre régions anatomiques distinctes : le cardia, le fundus, le corps et l'antrum pylorique (Figure 2).

Une fois dans l'estomac, la progression du bol alimentaire est contrôlée grâce au sphincter pylorique situé à son embouchure distale, permettant de retenir le contenu

alimentaire pendant plusieurs heures au niveau gastrique. La rétention du bol alimentaire par l'estomac va permettre son brassage mécanique et le début de sa digestion enzymatique. Les régions du fundus et du corps de l'estomac sécrètent des sucs digestifs en quantité importante qui contiennent un large panel de molécules telles que des enzymes digestives (pepsine et lipase). Ces sécrétions contiennent aussi de l'acide chloridrique responsable d'un pH luminal très bas ($\text{pH} < 3$ en période de digestion), favorable au processus de digestion et qui limite la survie des microorganismes. Le sphincter du cardia empêche la remontée du contenu gastrique vers l'œsophage.

La partie distale de l'estomac, l'antré, est hautement contractile du fait de la présence de couches musculaires superposées au sein de sa paroi qui assurent l'homogénéisation du contenu luminal. Le mélange semi-liquide obtenu lors de ces étapes est appelé chyme. Ces contractions musculaires coordonnées avec l'ouverture et la fermeture du sphincter pylorique régulent le passage progressif du chyme vers l'intestin grêle.

L'absorption des nutriments n'est pas assurée par l'estomac mais il produit le facteur intrinsèque, indispensable à l'absorption de la vitamine B12 dans l'intestin grêle.

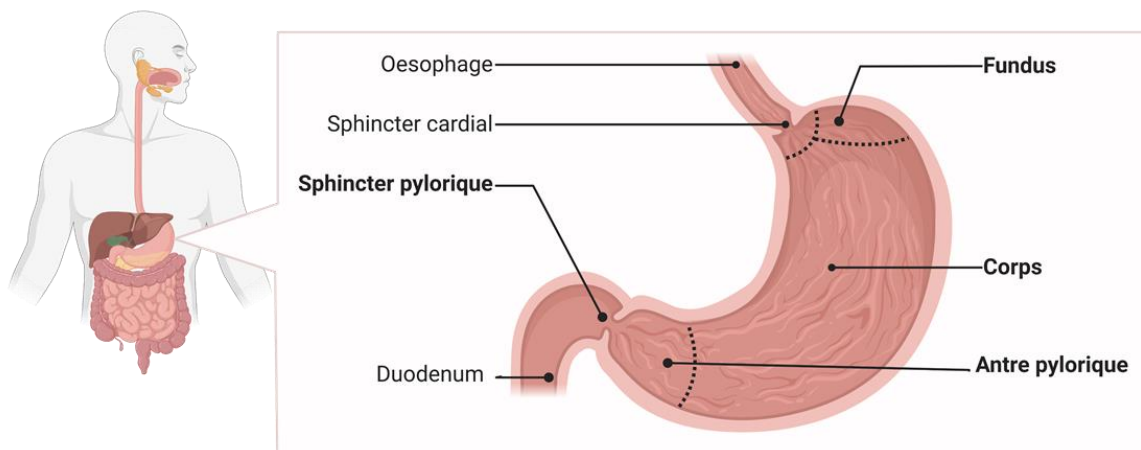


Figure 2: représentation schématique de l'estomac humain.

Figure créée avec Biorender.com.

c) L'intestin grêle

Délimité d'un côté par le sphincter pylorique qui assure la liaison avec l'estomac, et de l'autre côté par la valvule iléo-caecale, assurant la transition avec le gros intestin, l'intestin grêle est divisé en trois segments (duodénum, jéjunum, iléon) et représente la partie la plus

longue du tube digestif chez l'Homme (environ 6 à 7 mètres) [1]. L'essentiel des étapes de digestion et d'absorption des nutriments a lieu au niveau de cet organe, nécessitant une parfaite synchronisation avec les glandes annexes telles que le pancréas et la vésicule biliaire. Ces processus rendent la progression du bol alimentaire lente dans l'intestin grêle, avec un temps de transit estimé à environ 4 à 5h chez l'adulte [2].

Le duodénum, de taille courte (25 à 30 cm), assure le mélange du chyme provenant de l'estomac avec les sécrétions biliaires et pancréatiques qui émanent respectivement du canal cholédoque et du canal pancréatique [1]. Les enzymes pancréatiques (amylases, protéases et lipases) digèrent les glucides, les protéines et les lipides. Les sels biliaires jouent quant à eux un rôle important dans l'absorption des nutriments liposolubles (lipides, vitamines). Le duodénum permet également l'assimilation du fer alimentaire [3].

Le jéjunum, mesurant environ 2,5 m, est le site majeur d'absorption d'eau et des nutriments dans le tube digestif [4]. Cette fonction est progressivement parachevée dans le dernier segment de l'intestin grêle, l'iléon (d'environ 3 m), qui permet l'absorption de la vitamine B12 et la réabsorption des sels biliaires.

Chez l'Homme, l'importante capacité absorptive de l'intestin grêle est permise par la structure très particulière de sa surface luminale, la muqueuse, qui lui permet d'augmenter prodigieusement la surface d'échange entre l'organisme et l'environnement luminal (Figure 3). Elle décrit en effet une succession de repliements eux-mêmes hérissés d'une succession de villosités, ce qui permettrait à cet organe d'atteindre une surface d'échange atteignant près de 30 m² [5].

Une fois absorbés, les nutriments pénètrent dans la circulation sanguine par le biais d'un dense réseau de capillaires sanguins vascularisant chaque villosité. La veine porte permet leur transport vers le foie où ils seront stockés, métabolisés ou redistribués vers différents organes. Tout comme l'estomac, l'intestin grêle a un rôle sécrétoire important. Vers la lumière d'abord, où il déverse des quantités importantes de mucus, mais également vers la circulation sanguine dans laquelle il sécrète de nombreuses hormones et peptides aux effets pléiotropes [6], [7].

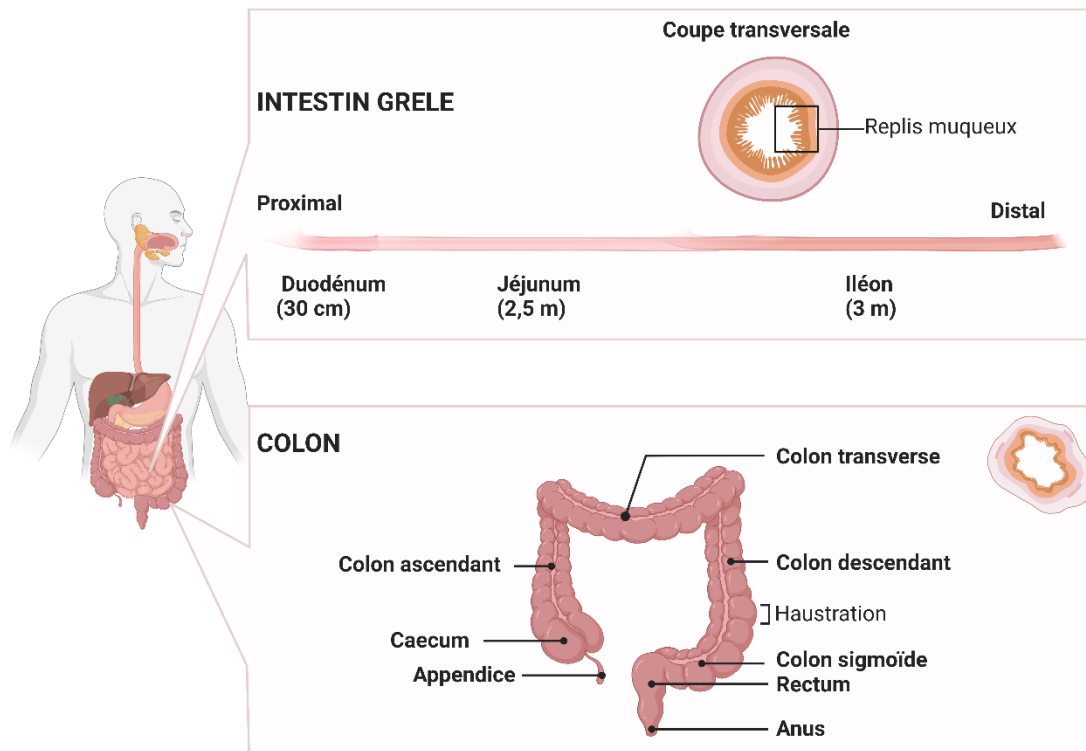


Figure 3: anatomie de l'intestin grêle et du colon humains.

L'intestin grêle se décompose en 3 segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Sa muqueuse se caractérise par de nombreux replis qui augmentent la surface d'échange. L'intestin grêle précède le colon où les différents segments sont représentés. Figure créée avec Biorender.com.

d) Le gros intestin

A la suite de l'intestin grêle se trouve le gros intestin, qui est la portion terminale du tube digestif. Il tient son nom de son diamètre important (environ 4 à 5 cm) qui diminue au niveau de ses parties les plus distales [5]. D'une longueur d'environ 1,5 m chez l'adulte le gros intestin se compose successivement du cæcum, de l'appendice, du colon, du rectum et du canal anal [1].

Le contenu iléal se déverse dans le cæcum, un réservoir de large diamètre se poursuivant par le colon. Ce dernier est composé de 4 sections nommées d'après leur localisation dans l'abdomen et leur configuration spatiale. On retrouve ainsi : le colon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (Figure 3). En réabsorbant l'eau et les électrolytes résiduels du bol alimentaire, le tissu colique joue un rôle majeur dans la formation des selles [8]. On y retrouve la présence de nombreux microorganismes dont l'activité métabolique participe à la digestion en sécrétant des enzymes (protéases, lipases et glycosidases) et à la synthèse de vitamines [9].

D'aspect extérieur, le colon humain décrit une succession de bosselures nommées haustrations. Des contractions lentes et contrôlées de la paroi colique (le péristaltisme) vont permettre la segmentation des selles ainsi que leur progression d'haustration en haustration. Les matières fécales terminent leur course dans le rectum où elles sont retenues par un sphincter musculaire en attendant la défécation via le canal anal.

1.2. Histologie de la paroi gastro-intestinale

D'un point de vue histologique, l'ensemble des organes du tube digestif présente une organisation similaire consistant en une superposition de couches tissulaires concentriques (tuniques) leur permettant d'assurer l'ensemble de leurs fonctions (Figure 4). Cette section se concentrera sur les caractéristiques de l'intestin grêle, du colon et de l'estomac qui ont été les organes cibles de mes travaux de thèse.

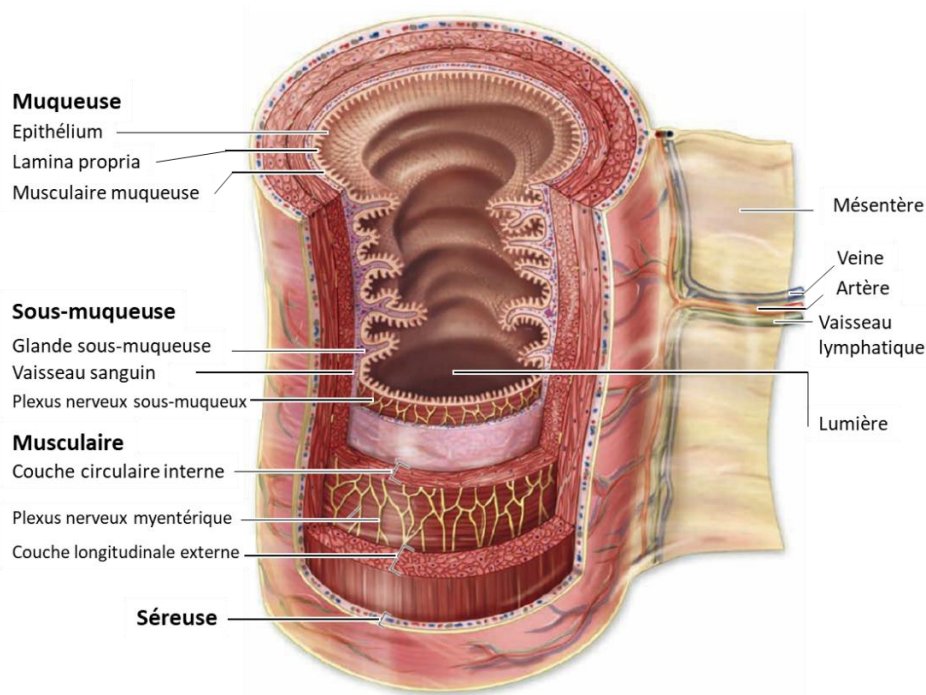


Figure 4: représentation schématique des tuniques histologiques du tube digestif.

Figure adaptée de Junqueira's Basic Histology, 14th edition.

De la couche la plus externe vers la couche la plus interne, on distingue ainsi :

- **La séreuse et l'adventice**, qui recouvrent la plupart des organes internes. Ce tissu est appelé séreuse lorsqu'il recouvre un organe relié au péritoine via le mésentère ou adventice dans le cas des organes situés en dehors de la cavité péritonéale. La séreuse et l'adventice sont composées de tissu conjonctif recouvert d'un épithélium squameux (le mésothélium) qui sécrète un liquide séreux réduisant les forces de friction lors des mouvements digestifs. Cette tunique externe est également le point de passage des systèmes sanguins, lymphatiques et nerveux pour accéder aux tuniques plus internes.
- **La musculuse externe** constitue une paroi épaisse composée de deux couches musculaires lisses superposées. Les fibres musculaires de la couche la plus externe sont orientées longitudinalement, alors que celles de la couche interne sont circulaires par rapport au tube digestif. Entre ces deux strates, un réseau de ganglions neuronaux forme le plexus myentérique (ou plexus de Auerbach) qui contrôle la contraction des cellules musculaires. La fonction primaire de la musculuse externe est d'assurer le brassage et la progression du bol alimentaire dans le tractus gastro-intestinal, le péristaltisme. Dans l'estomac, une troisième couche musculaire oblique est retrouvée, permettant une homogénéisation optimale du chyme alimentaire.
- **La sous-muqueuse** est séparée de la musculuse externe par le plexus nerveux sous-muqueux (dit de Meissner) qui innerve la muqueuse et régule ses fonctions. La sous-muqueuse est composée d'une couche de tissu conjonctif lâche soutenant la muqueuse et permettant d'amortir les déformations du tissu intestinal lors des contractions péristaltiques. Elle contient d'importantes quantités de cellules immunitaires et un large réseau sanguin et lymphatique vascularisant la muqueuse.
- **La muqueuse** est la tunique la plus interne du tube digestif et est elle-même composée de trois couches tissulaires :

La musculaire muqueuse (*muscularis mucosae*) est une fine couche musculaire à la jonction entre la muqueuse et la sous-muqueuse. Elle contient des fibres musculaires circulaires et longitudinales qui maintiennent les couches sous-jacentes en mouvement,

améliorant leur surface de contact avec le contenu luminal et favorisant l'expulsion de leurs produits de sécrétion.

La lamina propria ou **chorion** est un tissu conjonctif en contact avec l'épithélium, assurant trois fonctions principales. Une fonction mécanique d'abord, assurées par les cellules mésenchymateuses produisant une matrice protéique extracellulaire sur laquelle adhère l'épithélium. L'élasticité de cette matrice donne une relative liberté de mouvement à l'épithélium par rapport aux tuniques plus externes. Les fibroblastes, l'un des types cellulaires mésenchymateux les plus abondants de la *lamina propria*, sécrètent également des composés régulant la plasticité épithéliale. La *lamina propria* accueille aussi des vaisseaux lymphatiques et sanguins qui délivrent les nutriments à l'épithélium muqueux et prennent en charge ses produits de sécrétion et d'absorption. Enfin, la *lamina propria* présente une grande concentration de cellules immunitaires permettant l'échantillonnage du contenu luminal et la protection de l'organisme contre les agents pathogènes de la lumière intestinale.

L'épithélium est la couche cellulaire qui tapisse la face interne du tube digestif et marque la bordure entre le milieu intérieur de l'organisme et la lumière intestinale. Il assure une fonction complexe entre perméabilité aux nutriments et barrière face aux pathogènes et contaminants luminaux. Les cellules épithéliales assurent d'ailleurs la plupart des processus digestifs, absorbatifs et sécrétoires du tractus gastro-intestinal. L'épithélium est un tissu hautement spécialisé dont l'organisation diffère considérablement selon le segment du tube digestif observé. Dans la cavité buccale, anale et dans l'œsophage l'épithélium est essentiellement protecteur et présente une organisation squameuse stratifiée. En revanche, au niveau gastrique et intestinal, on retrouve une simple couche de cellules épithéliales polarisées et prismatiques (plus hautes que larges).

1.3. Physiologie de l'épithélium gastro-intestinal

Assurant l'interface entre la lumière intestinale et l'organisme, l'épithélium est un tissu clé dans le maintien de l'homéostasie. Ses nombreuses fonctions sont supportées par une importante diversité des cellules qui le composent, dont le renouvellement et l'organisation spatiale est finement régulée. Dans cette section nous passerons en revue les étapes principales menant au développement d'un épithélium fonctionnel, ainsi que son organisation cellulaire pour mieux comprendre comment sont régulées ses fonctions. Une emphase particulière sera mise sur l'épithélium de l'intestin grêle et du colon qui, bien que comportant des différences fonctionnelles, présentent des homologies importantes. Enfin, afin d'introduire au mieux les notions développées dans les résultats de cette thèse, l'épithélium gastrique sera aussi brièvement introduit.

1.3.1. Développement de l'épithélium intestinal

Comprendre l'origine développementale d'un organe permet de mieux appréhender les fondements de sa physiologie à l'âge adulte. Chez l'Homme, la genèse du tube digestif débute dès la 3^{ème} semaine de grossesse, à partir des trois feuillets cellulaires embryonnaires (l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme), qui sont à l'origine de l'ensemble des organes du fœtus [10]. L'épithélium digestif est formé à partir des cellules de l'endoderme, le mésoderme engendre à terme les structures musculaires et mésenchymateuses du tube digestif et l'ectoderme est à l'origine du système nerveux.

Sur un plan histologique, l'épithélium de l'intestin primitif est d'abord pseudostratifié et hautement prolifératif (Figure 5) [11], [12]. Il se réorganise ensuite progressivement selon une vague cranio-caudale et, à partir de la 10^{ème} semaine, ses cellules se polarisent formant une monocouche continue le long du tractus digestif. De manière concomitante, les cellules du mésenchyme se condensent sous l'épithélium et forment des protubérances d'environ 0,5-1,5 mm en direction de la lumière, les villosités. Au cours de la 11^{ème} et 12^{ème} semaine de gestation, l'épithélium commence à se différencier le long des villosités [13]. L'espace inter-villositaire, qui formera bientôt des glandes nommées cryptes de Lieberkühn, concentre des cellules immatures proliférantes qui se spécialisent progressivement en migrant vers le haut

des villosités. A terme, les villosités disparaissent dans le colon formant un épithélium relativement plat, ponctué de cryptes [14]. A ce stade, l'épithélium digestif atteint sa structure histologique définitive, même si sa maturation continue jusque dans les périodes post-natales.

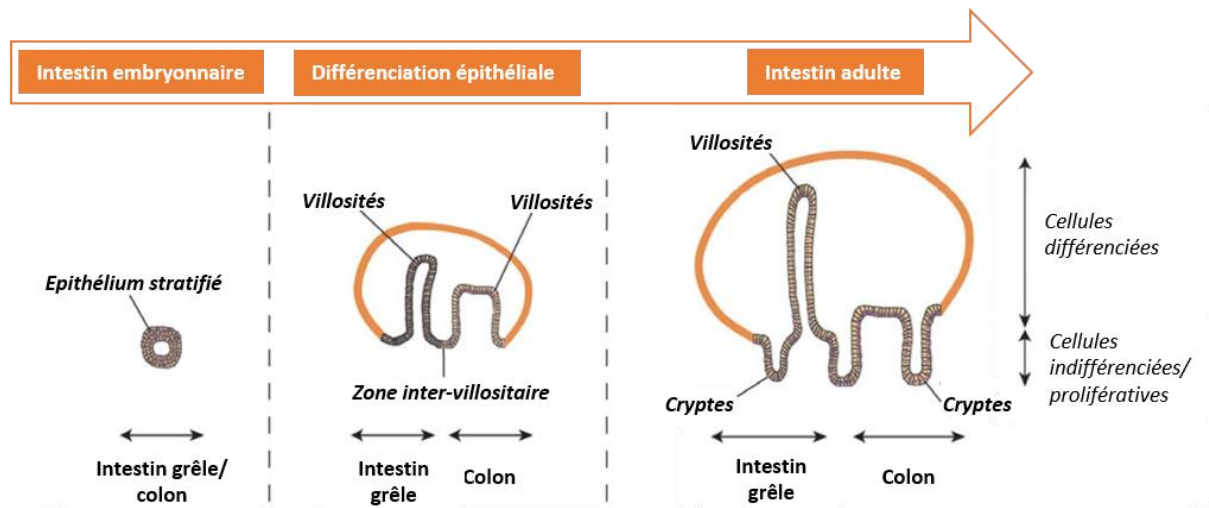


Figure 5: développement embryonnaire de l'épithélium intestinal.

Représentation schématique illustrant les grandes étapes du développement de l'épithélium intestinal. Figure adaptée de De Santa Barbara, Van den Brink, et Roberts 2003 [14].

1.3.2. Composition cellulaire et renouvellement de l'épithélium intestinal

A maturité, l'épithélium intestinal est organisé en une succession de cryptes et de villosités. La crypte est considérée comme l'unité fonctionnelle de base de ce tissu car elle assure le renouvellement rapide et constant de l'épithélium. L'axe crypto-villositaire est compartimenté. Au fond des cryptes, qui forment des invaginations dans le mésenchyme, on retrouve une niche de cellules indifférenciées et prolifératives dites « cellules souches intestinales » (CSI). Les cellules issues de la division des CSI forment des progéniteurs qui migrent le long de la crypte au fur et à mesure de leur différenciation, jusqu'à atteindre le haut des villosités. A la fin de leur cycle de vie, les cellules différenciées ayant migré au sommet des villosités vont être exfoliées vers la lumière et subir une anoïkis : une apoptose induite par la perte d'adhésion cellulaire. Ce processus est indispensable au renouvellement de l'épithélium digestif. Bien que les villosités ne soient pas présentes dans le colon, ce schéma général de différenciation des cellules du bas vers le haut de la crypte est aussi vrai pour cet organe (Figure 6).

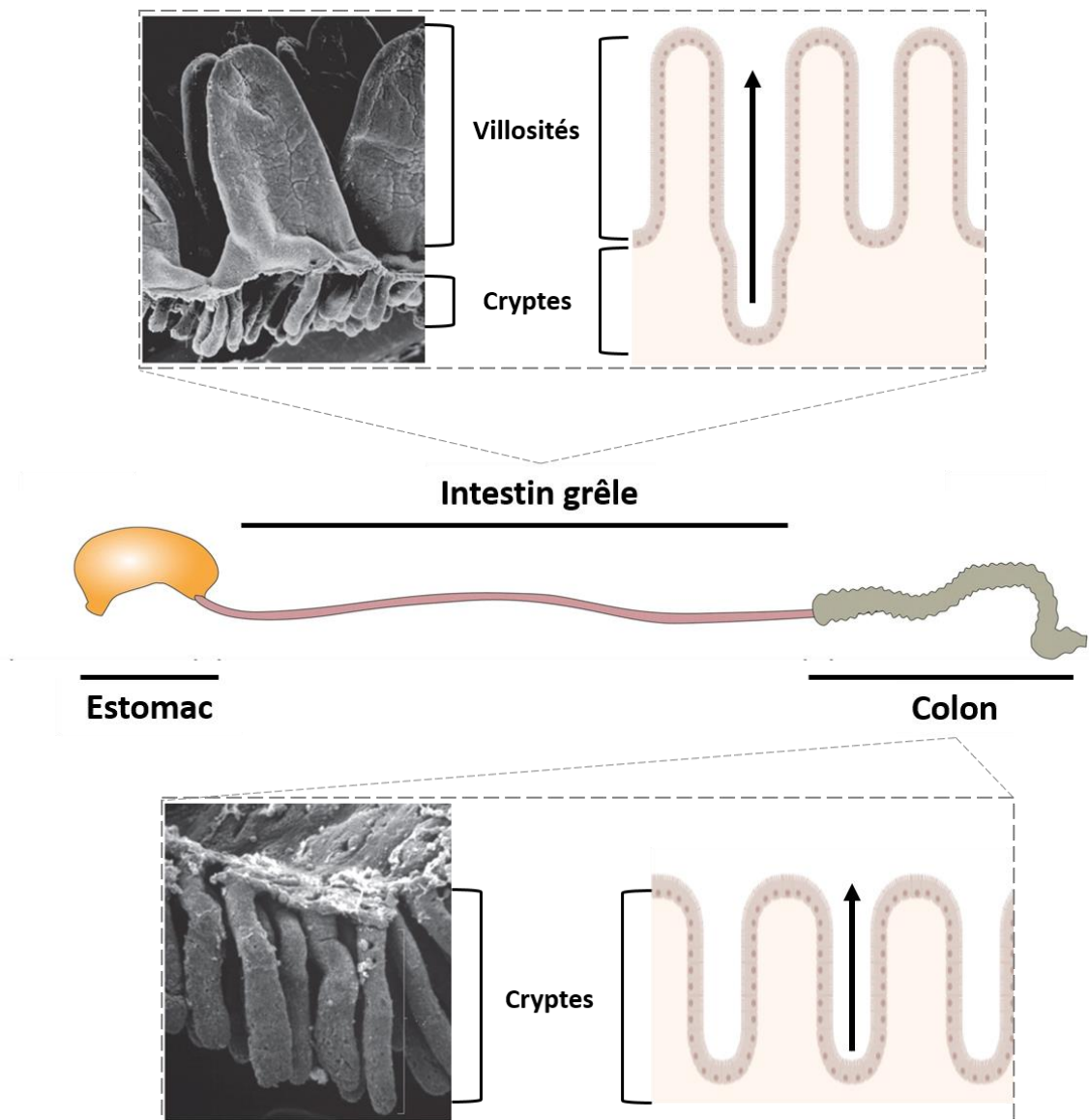


Figure 6: architecture de l'épithélium dans l'intestin grêle et le colon.

Images de microscopie électronique à balayage montrant l'architecture épithéliale de l'intestin grêle (panel du haut) et le colon (panel du bas). Le sens de différenciation cellulaire est indiqué par une flèche. Figure adaptées de Barker 2014 et de Kayisoglu *et al.*, 2021 [15], [16].

a) Cellules souches intestinales actives et renouvellement épithélial

L'épithélium intestinal est l'un des tissus au taux de renouvellement parmi les plus rapides chez les mammifères, avec un renouvellement cellulaire estimé à environ 4-5 jours chez le rongeur [17]. L'hypothèse qu'une population cellulaire unique soit responsable du renouvellement de l'ensemble des cellules épithéliales intestinales différenciées a été avancée dès la fin du XIX^{ème} siècle. Cependant, ce n'est qu'en 1974 que les travaux de Cheng et Leblond identifièrent une population de cellules basée au fond des cryptes et pouvant s'apparenter à des cellules souches. Ces cellules, qualifiées alors de « Crypt Base Columnar

cells » (CBC), possédaient une activité mitotique importante et semblaient responsables de la genèse des cellules différenciées [18]. Grâce à des méthodes de traçage cellulaire par mutagenèse chimique, Bjerknes *et al.* ont plus tard démontré que les CBC possédaient une longue durée de vie au sein des cryptes et que les clones dérivés de ces cellules comprenaient l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium, confortant l'idée que les CBC sont douées de multipotence et d'auto-renouvellement [19]. Ces cellules ont depuis été largement étudiées et sont désormais considérées comme les cellules souches actives de la crypte intestinale en condition physiologique. Les CBC expriment fortement la protéine membranaire Lgr5, récepteur de la R-spondine, qui maintient active la voie Wnt responsable de leur auto-renouvellement [20], [21]. Chez la souris, le traçage des cellules Lgr5-positives a démontré que ces cellules : i) persistaient dans l'intestin, ii) avaient un cycle cellulaire rapide (environ 21,5 h) et iii) étaient capables d'engendrer l'ensemble des types cellulaires différenciés de l'épithélium [20], [22], [23].

b) Contrôle du destin des cellules souches intestinales : rôle de la niche

Subsistant à la base des cryptes, les CSI sont en étroite relation avec les cellules avoisinantes et des protéines de matrice extracellulaire qui forment un microenvironnement nommé « niche », essentiel à leur pérennité. Au fond des cryptes, les CSI sont notamment intercalées entre des cellules épithéliales de soutien, nommées cellules de Paneth dans l'intestin grêle ou « deep crypt secretory cells » (DCS) dans le colon [24]. Elles sont aussi en contact avec le stroma sous-jacent qui contient des cellules mésenchymateuses, immunitaires et nerveuses. La niche formée par ce voisinage cellulaire transmet de nombreux signaux qui coordonnent le maintien d'une population souche tout en permettant la différenciation d'une partie des CSI.

Les cellules de soutien (Paneth, DCS) et les cellules mésenchymateuses jouxtant la base des cryptes produisent de nombreux ligands activateurs des voies de signalisation Wnt/ β -caténine, Notch ou EGF qui contrôlent l'activité des CSI. L'activation de ces voies est retrouvée de manière décroissante le long de l'axe crypto-villositaire (Figure 7).

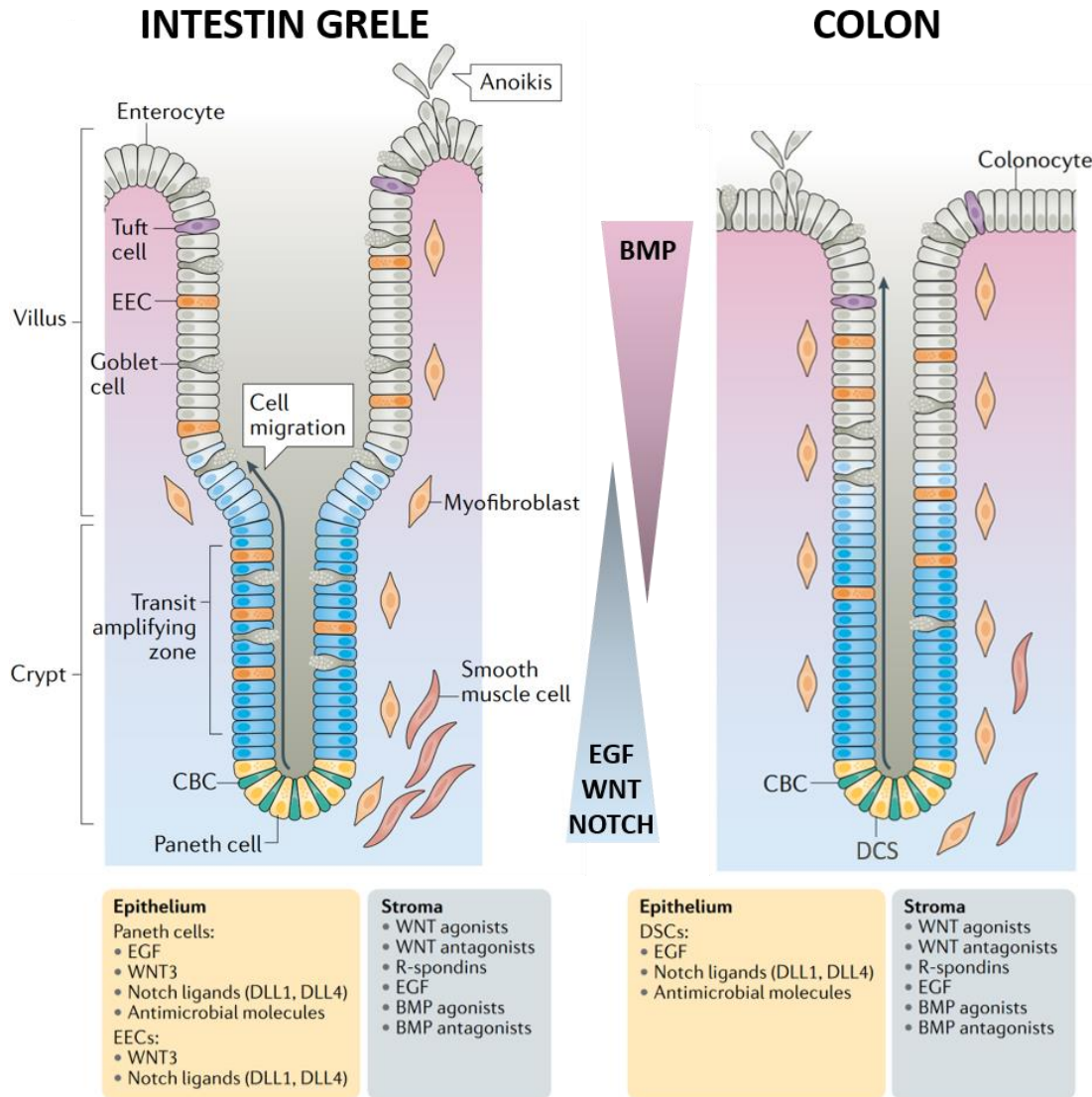


Figure 7: renouvellement et différenciation des cellules souches intestinales.

Les cellules souches intestinales (CBC), localisées en fond de cryptes, sont responsables du renouvellement cellulaire de l'épithélium. L'homéostasie du compartiment souche est assurée par la sécrétion de nombreux facteurs dans l'environnement immédiat des CSI. Ces facteurs de niche proviennent des cellules épithéliales mais aussi du stroma (voir encarts). Ils favorisent une forte activité des voies WNT, NOTCH et EGF, essentielles pour le maintien des cellules souches. Ces voies diminuent en activité au cours de la différenciation épithéliale en faveur de la voie BMP. (EEC : cellules entéro-endocrines). Figure adaptée de Beumer et Clevers 2021 [25].

L'activation concomitante des voies de signalisation Wnt et Notch est primordiale au maintien du pool de cellules souches dans la crypte. Dans la littérature, le blocage de l'une ou l'autre de ces voies a été associée à une déplétion des CBC [26], [27], [28]. En se fixant sur leur récepteur Frizzled exprimé par les CSI, les ligands solubles de type Wnt tels que Wnt-3, -6 et -9b promeuvent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la progression du

cycle cellulaire, cruciaux pour l'identité des cellules souches [29]. A la surface des CBC, l'activation de la voie Notch repose sur un contact physique entre un des récepteurs de la famille Notch et une cellule adjacente non souche exprimant de manière transmembranaire un des ligands de cette voie (tels que Dll1 ou Dll4). Ces ligands sont particulièrement exprimés par les cellules de Paneth et DCS, renforçant leur importance au sein de la niche [30].

La voie « Epidermal growth factor » (EGF) est un autre acteur majeur qui induit la prolifération des CSI. Ces dernières expriment fortement les récepteurs de la famille de l'EGF, dont les différents ligands sont produits par les cellules de Paneth et stromales [30], [31]. Le blocage de la voie EGF conduit à l'arrêt du cycle cellulaire des CBC, à l'inverse la levée de son inhibition est associée à une expansion brutale du compartiment souche [32], [33].

Bien que le mode de division des CBC en condition physiologique reste débattu, le modèle le plus largement accepté privilégie une division symétrique de ces cellules. Chaque cellule souche génèrerait ainsi deux cellules filles identiques [34], [35]. Par extension, ce modèle donne un rôle prépondérant aux facteurs extrinsèques cités précédemment. En effet, le nombre de cellules de soutien (Paneth ou DCS), indispensables au maintien des CBC, semble relativement invariable au fond des cryptes. Dans une même crypte, l'ensemble des CSI se retrouverait donc en compétition pour rester dans la zone de contact avec les cellules de soutien [36]. Les CBC migrant en dehors de la niche, perdent le contact avec les voies de signalisation associées et s'engagent alors rapidement dans un processus de différenciation [36], [37]. Créant un flux cellulaire dynamique, cette compétition pourrait favoriser les cellules les plus enclines à conserver leurs caractéristiques souches [38].

c) Différenciation des cellules souches intestinales et zone d'amplification transitoire

La différenciation des CSI débute donc lorsqu'elles perdent le contact avec le microenvironnement de la niche. Elles se retrouvent alors dans une zone dite « d'amplification transitoire » (TA) où s'initie progressivement leur différenciation. Deux voies de différenciation des progéniteurs épithéliaux peuvent être distinguées dans l'intestin, conditionnant les fonctions assurées au terme de leur maturation : le lignage absorptif et le lignage sécrétoire (Figure 8).

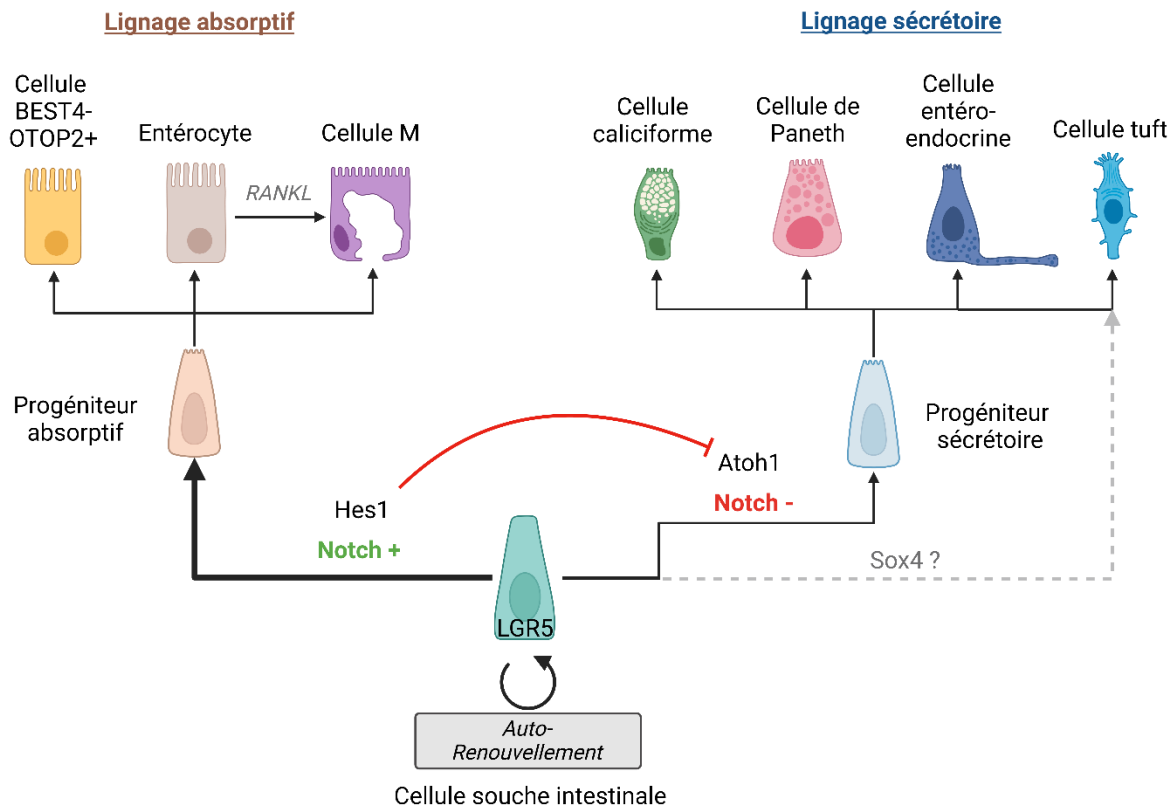


Figure 8: différenciation des cellules souches intestinales.

Figure créée avec Biorender.com.

La différenciation sécrétoire des CSI est permise par le facteur de transcription Atoh1. La voie Notch exerce un contrôle négatif sur cette voie de différenciation car elle promeut l'expression d'un second facteur de transcription nommé Hes1, qui réprime l'expression d'Atoh1 [39]. Les CSI entrant dans la zone TA, perdent le contact avec les cellules de soutien (Paneth, DCS) qui expriment les ligands de la voie Notch (Dll1, Dll4). La perte d'activation de cette voie entraîne un engagement de ces cellules dans la différenciation sécrétoire. Ces progéniteurs sécrétoires expriment à leur tour des ligands Notch à leur surface, favorisant la différenciation absorptive des progéniteurs voisins en permettant l'induction du facteur Hes1 [40]. L'expression du facteur Hes1 chez les progéniteurs absorptifs leur confère une haute activité proliférative à la différence des progéniteurs sécrétoires [37], [41]. Ce phénomène nommé inhibition latérale permet un contrôle fin du ratio cellules sécrétrices/cellules absorptives, en privilégiant un plus grand nombre de progéniteurs absorptifs.

La différenciation des progéniteurs est également régulée par des voies de signalisation telles que la voie « Bone Morphogenetic Proteins » (BMP). Les ligands de la voie

BMP sont produits par les cellules stromales du haut de la crypte et des villosités, alors que les cellules de la niche produisent des inhibiteurs de cette voie (Noggin). On retrouve donc un gradient d'activité croissant de la voie BMP du bas de la crypte vers le haut des villosités qui conduit à la répression des marqueurs de multipotence tels que : Lgr5, Pdgfra, Sox9, Olfm4, Cdk6 et Cdca7 [42].

A l'exception des cellules de Paneth qui restent localisées à la base des cryptes, les progéniteurs se déplacent vers le haut des cryptes au fur et à mesure de leur différenciation. Sept types cellulaires différenciés ont été décrits dans l'épithélium intestinal et colique jusqu'ici.

d) Les cellules absorptives différenciées

Les entérocytes ou colonocytes : représentent le type cellulaire le plus abondant (environ 80%) dans l'intestin grêle (entérocytes) et le colon (colonocytes). Ce sont des cellules cylindriques, polarisées et dont la bordure apicale dite « en brosse » présente des microvillosités permettant d'augmenter leur surface d'échange avec la lumière intestinale. Leur fonction principale est la digestion, l'absorption sélective et le transport des nutriments vers la circulation sanguine. Pour cela elles expriment des enzymes digestives transmembranaires à leur pôle apical (sucrase-isomaltase, lactase, aminopeptidase), ainsi qu'un large panel de récepteurs aux nutriments lipidiques, glucidiques et peptidiques [43]. Les entérocytes et colonocytes régulent également les flux hydriques de part et d'autre de la barrière épithéliale via l'expression de transporteurs d'ions qui modifient le gradient électrolytique [44].

Les cellules Microfold (M) : ces cellules sont présentes dans des zones particulières de l'épithélium de l'intestin grêle (sans villosités) et recouvrent des organes lymphoïdes secondaires nommés plaques de Peyer [45]. Ces plaques de Peyer contiennent un grand nombre de cellules de l'immunité adaptative regroupées en follicules et font partie du réseau de tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, aussi appelé GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue). Au sein des follicules, les lymphocytes sont mis en contact avec les antigènes luminaux par des cellules présentatrices d'antigènes, afin de guider les réponses immunitaires adaptatives. Les cellules M tiennent leur nom de la présence de structures en forme de plis à

leur surface apicale et d'une grande invagination à leur pôle basal. Elles sont spécialisées dans la capture d'antigènes luminaux et de microorganismes entiers afin de les délivrer aux cellules immunitaires des plaques de Peyer.

Les cellules BEST4/OTOP2 : représentent un sous-type épithélial récemment identifié dans le colon humain. Elles sont caractérisées par l'expression unique du canal au chlore BEST4 et du canal à proton OTOP2 [46]. Elles semblent appartenir à la lignée absorptive car elles expriment de nombreux marqueurs entérocytaires. Leurs fonctions précises restent floues, mais elles semblent impliquées dans la régulation du pH luminal via la recapture de protons et le transport d'ions, métaux et sels. Des cellules similaires ont aussi été identifiées dans l'intestin grêle humain, mais semblent présenter des différences fonctionnelles avec les cellules BEST4+ du colon car elles expriment fortement le canal chlorure CFTR [47], [48]. Le groupe de Hans Clevers a ainsi proposé de renommer ces cellules BCHE pour « BEST4, CFTR high-expressor » [48]. Dans cette même étude, les auteurs ont aussi associé les BCHE avec la production de peptides régulant la prise alimentaire et la motilité intestinale.

e) Les cellules sécrétrices différenciées

Comme leur nom l'indique, les cellules sécrétoires ont pour fonction de produire et sécréter divers facteurs vers la lumière intestinale ou le milieu interne de l'organisme.

Les cellules caliciformes : nommées ainsi de par leur morphologie en « gobelet », ce sont les cellules sécrétrices les plus abondantes de l'intestin grêle et du colon représentant respectivement 10 à 20 % des cellules épithéliales totales [45]. Leur cytoplasme est rempli de vésicules de sécrétion et leur mission primaire est de sécréter des mucines. Ces glycoprotéines participent à la formation du mucus, un hydrogel qui recouvre l'épithélium digestif. Des rôles additionnels de ce type cellulaire dans la capture d'antigènes et la production de peptides antimicrobiens ont également été rapportés [49].

Les cellules de Paneth : représentent l'exception au modèle de différenciation cryptovillositaire puisque, une fois différenciées, ces cellules migrent vers le fond des cryptes au contact des cellules souches [50]. Elles ont une durée de vie relativement longue comparé aux autres populations épithéliales, qui pourrait atteindre jusqu'à deux mois chez la souris [51]. En plus du rôle de régulation des CBC évoqué dans les parties précédentes, les cellules de

Paneth jouent un rôle clé dans la protection de l'épithélium en sécrétant de nombreux peptides antimicrobiens et autres facteurs de défense (α -défensines, cathélicidine, RegIII, lysozyme, phospholipase A2) [52].

Dans le colon, les cellules de Paneth ont historiquement été considérées comme absentes en condition physiologique [53]. Cependant, de larges cellules sécrétoires « deep crypt secretory » (DCS) parsemées entre les CBC Lgr5+ semblent assurer des fonctions similaires. Elles expriment les marqueurs cKit, Reg4 ainsi que plusieurs facteurs trophiques (EGF, ligands de la voie Notch : Dll1 et Dll4) et promeuvent le maintien des CBC [24], [48], [54], [55].

Les cellules entéro-endocrines : représentent moins de 1% des cellules épithéliales mais forment pourtant le plus large organe endocrine de l'organisme [56]. Ces cellules ont la capacité de sécréter un vaste panel d'hormones ou de neuropeptides en réponse à des stimuli provenant de la lumière intestinale ou des cellules environnantes. Ces facteurs sont sécrétés au pôle basolatéral des cellules entéro-endocrines par exocytose et agissent sur des cibles locales ou distantes du tube digestif, contrôlant ainsi des fonctions pléiotropes telles la prise alimentaire, la motilité intestinale ou encore la sécrétion pancréatique. Elles ont été historiquement classées en fonction de l'hormone unique qu'elles étaient censées exprimer. Il apparaît aujourd'hui que les cellules entéro-endocrines sont en réalité capables de produire plusieurs médiateurs de façon concomitante et adaptative, remettant en cause cette classification simpliste [57].

Les cellules Tuft : tiennent leur nom de l'important réseau microvillositaire présent à leur bordure apicale. Ce sont de rares cellules, représentant à peine 0,4% de l'ensemble des cellules épithéliales intestinales [58]. Identifiées dans les années 1950, leur fonction exacte est longtemps restée mystérieuse. Il semble aujourd'hui que les cellules Tuft jouent un rôle chimiosensoriel important via l'expression de nombreux récepteurs à leur face apicale. Par ailleurs, elles ont notamment été impliquées dans la mise en place de la réponse immune de type Th2 lors d'une infection parasitaire [59], [60], [61]. Un rôle important dans la niche des CSI a aussi été pointé pour ces cellules, via la production d'acétylcholine, un neurotransmetteur contrôlant la prolifération des CSI [62]. Enfin, plusieurs études proposent également que les cellules Tuft puissent promouvoir la progression tumorale [63], [64].

f) Plasticité épithéliale et réparation en conditions pathologiques

Comme évoqué dans les sections précédentes les CBC Lgr5+ sont donc largement considérées comme les cellules souches actives de la crypte, responsables du renouvellement épithélial en condition physiologique. Cependant, l'environnement complexe de l'intestin peut exposer l'épithélium à de nombreux facteurs affectant son intégrité (agents pathogènes, réactions inflammatoires, traitements médicamenteux...). L'épithélium intestinal affiche toutefois des propriétés de plasticité tout à fait remarquables à la suite de dommages tissulaires. Il est par exemple capable de se régénérer en quelques jours seulement après une exposition aiguë à des radiations [65], [66], [67]. Chez le rongeur, de nombreux modèles expérimentaux ont montré que les CBC Lgr5+ sont particulièrement sensibles aux stimuli de stress (irradiation, chimiothérapie, inflammation, infections parasitaires), pouvant entraîner une déplétion transitoire de cette population souche [68], [69], [70], [71]. De manière surprenante, Tian *et al.* ont montré qu'une délétion ciblée des cellules Lgr5+ n'avait que peu d'effet sur le renouvellement épithélial en condition physiologique [72]. En revanche, le rétablissement d'un pool de cellules Lgr5+ est indispensable à la réparation de l'épithélium à la suite de lésions causées par irradiation [66]. Ces données ont nourri l'idée que d'autres populations cellulaires dites « de réserve » pourraient être mobilisées en condition de stress afin de compenser la perte des CBC Lgr5+ (Figure 9).

Dans les années 1970, le groupe de Chris Potten a initialement décrit la présence de rares cellules situées quatre cellules en amont de la base de la crypte (en position +4), présentant un cycle cellulaire lent et persistant plusieurs semaines dans l'intestin [73]. Les cellules proches de cette position ont plus tard été décrites comme étant : douée d'une activité mitotique, très résistantes aux dommages tissulaires et capable de générer de nouvelles cellules différenciées [74], [75]. De ces découvertes a découlé l'hypothèse de l'existence d'une seconde population de CSI dites « +4 », quiescente en condition homéostatique et qui pourrait participer à la restauration épithéliale en condition de stress. L'existence d'une telle population souche « +4 », distincte des CBC, reste cependant grandement débattue dans la littérature car la plupart des marqueurs génétiques proposés pour ces cellules seraient aussi exprimés par les CBC et certains progéniteurs en voie de différenciation [76], [77].

Légende :

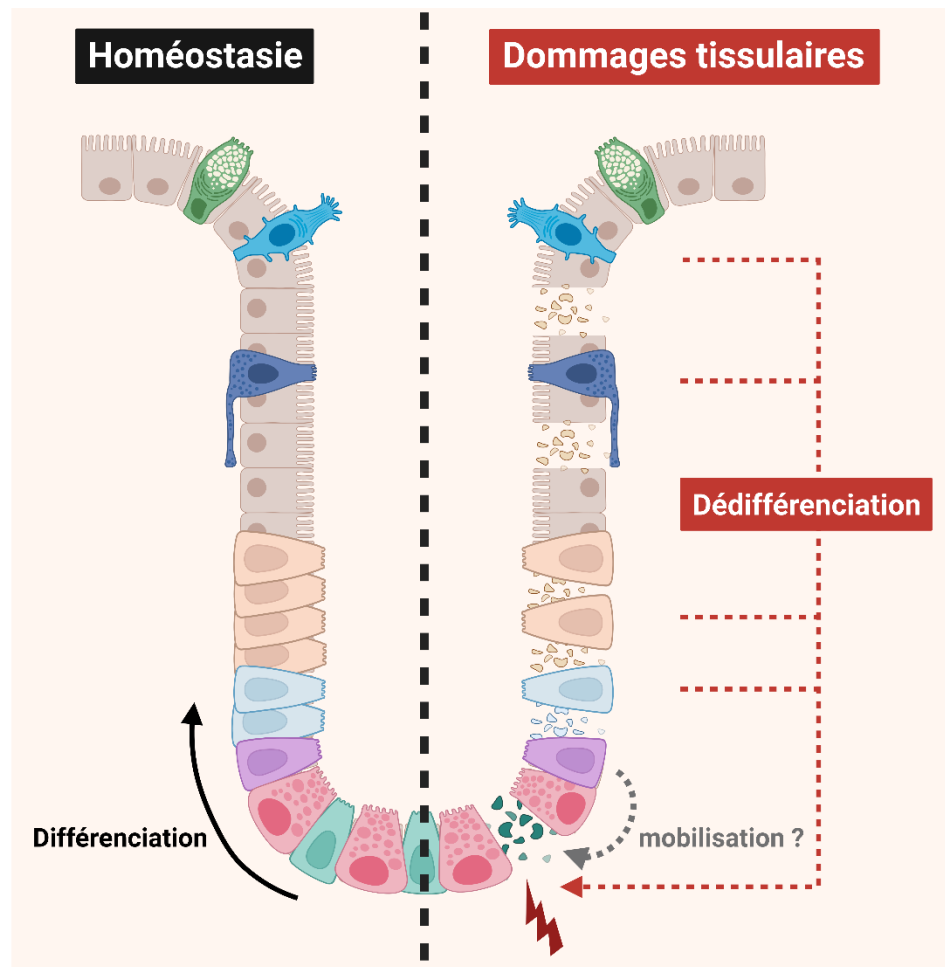
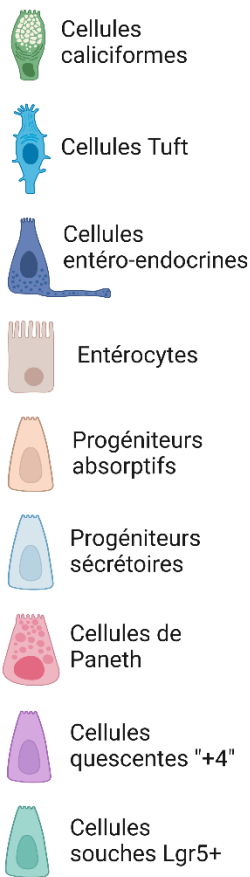


Figure 9: mécanismes potentiels de réparation épithéliale en condition pathologique.

De nombreux stimuli de dommages tissulaires peuvent entraîner la perte des cellules souches Lgr5+ qui sont à l'origine du renouvellement épithélial en condition physiologique. L'épithélium intestinal semble cependant doué d'une grande capacité de réparation face à ce type d'agression. Deux mécanismes sont proposés comme pouvant participer au rétablissement d'un pool de CSI. Premièrement, une population de cellules quiescentes, en position « +4 » par rapport au fond de la crypte, pourrait être mobilisée et retrouver une activité mitotique afin de restaurer les cellules Lgr5+. D'autre part, la perte des CSI Lgr5+ pourrait entraîner la dédifférenciation de cellules progénitrices ou différenciées au contact du microenvironnement de la niche, permettant la réparation de l'épithélium. Figure adaptée de Bankaitis *et al.*, 2018 [78] et créée avec Biorender.com.

Il apparaît aujourd'hui que la régénération de l'épithélium en condition pathologique tient plus d'une plasticité générale de l'ensemble des cellules épithéliales, étant capable de regagner un caractère « souche » au contact du microenvironnement de la niche, qu'à l'existence d'une unique population souche de réserve. En ce sens, Buczacki et collègues ont participé à montrer que les cellules présentes dans la zone « +4 » de la crypte pourraient en réalité être des progéniteurs sécrétoires (de cellules entéro-endocrines ou de Paneth) exprimant Lgr5 et dont la différenciation lente en condition physiologique (quelques

semaines) expliquerait la persistance évoquée précédemment [79]. Plus intéressant, lors de lésions épithéliales chimiquement induites ces progéniteurs étaient capables de retrouver un caractère « souche » afin de restaurer la diversité épithéliale *in vivo*. Depuis, cette capacité de dédifférenciation a aussi été montrée pour plusieurs autres sous-types épithéliaux dont des progéniteurs absorptifs et certaines cellules différenciées (cellules entéro-endocrines, de Paneth, entérocytes KRT20+), mettant en avant la grande aptitude « plastique » de ce tissu [80], [81], [82], [83].

Les signaux qui gouvernent cette dédifférenciation sont encore mal compris et font l'objet de recherches intensives. La plasticité épithéliale pourrait être au moins en partie expliquée par les grandes similitudes de profils épigénétiques (accessibilité et méthylation de la chromatine) rapportées entre les CSI Lgr5+ et les cellules différenciées [84], [85]. En contexte de réparation, cette absence de mécanisme de verrouillage épigénétique du processus de différenciation pourrait permettre aux facteurs trophiques de la niche (agonistes des voies Wnt, Notch, EGF) de redonner une identité de CSI aux cellules différenciées se retrouvant au fond de la crypte à la suite de la perte des CBC. Enfin, en dehors des voies de signalisation présentées précédemment, un niveau de preuve croissant place la voie de signalisation Hippo au centre des mécanismes de régénération épithéliale. Cette voie de signalisation intègre de nombreux signaux extracellulaires (mécano-transduction, activation de récepteurs membranaires) *via* une cascade de phosphorylation qui contrôle l'activité des régulateurs transcriptionnels YAP-TAZ (Yes-Associated Protein-Tafazzin) [86]. Il a notamment été montré que les facteurs YAP-TAZ sont indispensables à la régénération épithéliale dans des modèles murins d'irradiation ou d'inflammation intestinale chimiquement induite [87], [88]. En phase de réparation, le complexe YAP-TAZ agirait notamment en diminuant l'activation de la Wnt prévenant une différenciation accrue des CSI en cellules de Paneth [88], [89]. En condition d'inflammation, l'activation de YAP a aussi été associée à l'apparition d'une population cellulaire localisée aux abords de la position « +4 », caractérisée par l'expression du facteur « clusterine » et capable de reconstituer le pool de CBC Lgr5+ [90].

1.4. Grandes fonctions de l'épithélium intestinal

L'organisation complexe de l'épithélium intestinal et colique décrite dans les parties précédentes a pour vocation de supporter deux fonctions essentielles et étroitement coordonnées : une fonction d'absorption et une fonction de barrière sélective vis-à-vis des éléments présents dans la lumière. A cela peut être ajouté un rôle de communication avec les autres organes, nécessaire à la coordination des grandes fonctions physiologiques.

1.4.1. Fonction d'absorption

L'épithélium intestinal assure une tâche complexe consistant à faire passer les nutriments et l'eau du contenu luminal vers le milieu intérieur. Le passage de ces molécules aux caractéristiques physico-chimiques très diverses est assuré par différentes voies (Figure 10) :

- **La voie paracellulaire**, responsable du passage passif de petites molécules solubles entre les cellules. Elle sera développée dans la section suivante.
- **La voie transcellulaire**, assurant le transport de molécules très variées à travers le cytoplasme des cellules épithéliales.

L'absorption par voie transcellulaire est assurée par les entérocytes et nécessite de manière générale l'expression de transporteurs spécifiques par ces cellules.

Les mouvements hydriques de part et d'autre de l'épithélium sont intimement liés au transport des ions Na^+ , K^+ , HCO_3^- , et Cl^- . L'eau diffuse à travers la barrière épithéliale en suivant les gradients électrochimiques générés par le transport actif de ces ions de manière à rétablir l'équilibre isotonique [91].

Les nutriments protéiques sont principalement assimilés sous la forme de peptides ou d'acides aminés à la suite de leur hydrolyse par les protéases digestives. L'absorption des peptides est assurée par le transporteur PEPT1, alors que celle des acides aminés se fait par un réseau complexe de transporteurs de la famille des « Solute Carrier » (SLC) [92].

Le passage des glucides à travers la membrane entérocytaire se fait essentiellement sous forme monosaccharidique. Le glucose et le galactose sont absorbés via le transporteur SGLT1, alors que le fructose emprunte le transporteur GLUT5 [43].

Les lipides alimentaires, extrêmement hétérogènes, sont dégradés en monoglycérides, acides gras libres et cholestérol par les lipases luminales. Ils sont ensuite stabilisés sous forme de micelles par les sels biliaires. L'entrée des lipides dans les entérocytes a longtemps été considérée comme une diffusion simple à la suite du contact entre la micelle et la membrane cellulaire. Cependant, la découverte de nombreux transporteurs lipidiques à la surface des entérocytes a depuis fait émerger l'idée d'une potentielle coexistence de ces deux mécanismes d'entrée [93].

1.4.2. Fonction de barrière

En dehors des nutriments, la lumière intestinale est le lieu de passage ou de résidence de nombreux microorganismes et d'antigènes potentiellement nocifs. L'épithélium forme une véritable barrière qui contrôle l'exposition de l'organisme à ces éléments. Cette barrière est assurée par des lignes de défenses physiques, chimiques et immunitaires qui maintiennent l'homéostasie intestinale.

a) L'épithélium : une barrière physique

Les cellules épithéliales intestinales forment un revêtement continu et semi-étanche à la surface de la muqueuse permettant le passage sélectif des solutés tout en restreignant l'accès des pathogènes aux tissus internes. Pour cela, les cellules épithéliales adhèrent fermement les unes aux autres par un complexe de jonctions intercellulaires et sont également arrimées à la *lamina propria*. Ce complexe jonctionnel est composé de plusieurs types de jonctions intercellulaires, elles-mêmes formées par l'assemblage de protéines transmembranaires. Elles sont reliées au cytosquelette cellulaire, jouant un grand rôle dans la polarisation des cellules épithéliales intestinales. Ainsi du pôle apical au pôle basal des cellules épithéliales on retrouve (Figure 10) :

- **Les jonctions serrées** : entourant le pôle apical des cellules épithéliales, ce sont les principaux régulateurs de la perméabilité paracellulaire épithéliale. Les jonctions serrées sont en effet semi-perméables et permettent le passage de petites molécules comme des ions. Ces jonctions sont principalement formées par l'interaction de trois types de protéines transmembranaires entre deux cellules voisines : les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM). Les domaines intracellulaires de ces protéines sont liés à des protéines de soutien dont font partie la famille des *zonula occludens* (ZO) qui font le pont avec le cytosquelette d'actine de la cellule. Parmi les protéines transmembranaires, les claudines ont un rôle prépondérant dans la régulation de la perméabilité paracellulaire. Il existe plus d'une vingtaine de claudines différentes dont certaines ont des propriétés d'étanchéité, alors que d'autres forment des pores de taille et de sélectivité ionique variables [94]. La composition des jonctions serrées en claudine est finement régulée en fonction des segments intestinaux et de l'état physiologique de l'individu.
- **Les jonctions adhérentes** : localisées immédiatement en dessous des jonctions serrées. Elles sont composées de protéines transmembranaires, les E-cadhérines, qui s'ancrent à un complexe de protéines intramembranaires nommées caténines. Les caténines sont elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine. Avec les desmosomes, les jonctions adhérentes fournissent l'essentiel des forces nécessaires au maintien du contact cellule-cellule dans l'épithélium [95].
- **Les desmosomes** : forment un point d'ancrage entre les filaments intermédiaires du cytosquelette de deux cellules épithéliales adjacentes. Au niveau des desmosomes, deux cellules voisines s'assemblent via l'interaction entre des sous-types particuliers de cadhérines : les desmocollines et desmogléines. A leur extrémité cytosolique, ces cadhérines sont liées à une plaque protéique (desmoplakine) sur laquelle viennent s'ancrer les filaments intermédiaires de cytokératine.
- **Les jonctions communicantes** : ce type de jonction forme un canal permettant la communication entre les cytoplasmes de deux cellules en contact. Chacune de ces jonctions est formée par la liaison de deux connexons (un par cellule), eux-mêmes composés de six protéines transmembranaires : les connexines.

- **Les hémidesmosomes** : situés au pôle basal des cellules épithéliales, ce sont des complexes semblables aux desmosomes mais qui relient une cellule épithéliale à la lame basale.

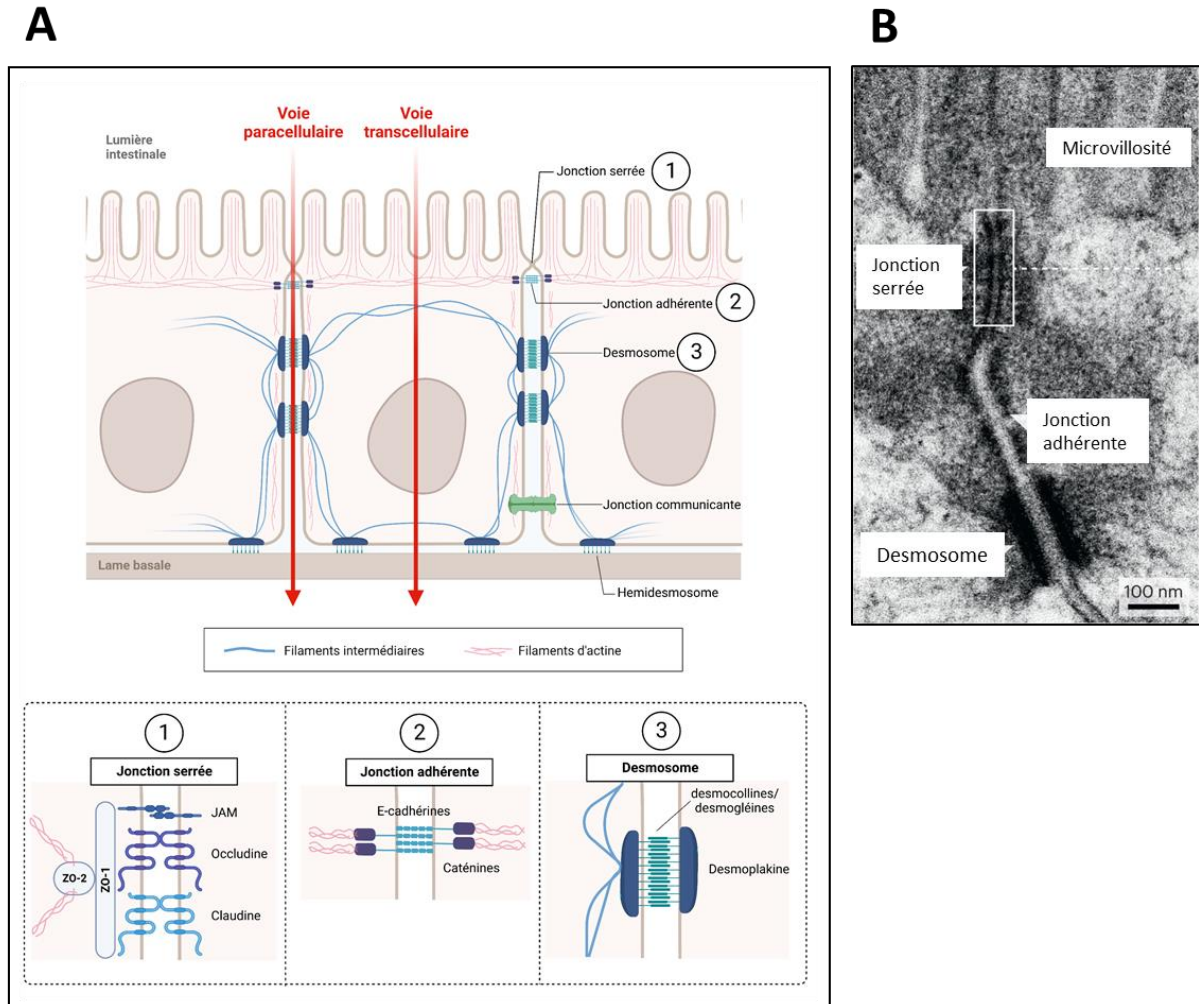


Figure 10: voie de passage paracellulaire et transcellulaire et organisation des jonctions cellulaires de la barrière épithéliale intestinale.

(A) Représentation schématique des jonctions cellulaires et de leurs interactions avec le cytosquelette des cellules épithéliales intestinales. Les voies de passage paracellulaire et transcellulaire des macromolécules luminales à travers l'épithélium sont aussi représentées. Figure Inspirée de Barbara *et al*, 2021 [96]. (B) Micrographie électronique à transmission montrant les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes des cellules épithéliales intestinales. Image issue de Horowitz *et al*, 2023 [97].

La perméabilité paracellulaire de l'épithélium est donc finement régulée par la présence de diverses jonctions intercellulaires. Cependant, le seuil de coupure dicté par ces jonctions n'est pas fixe et peut-être régulé par de nombreux facteurs. A l'état basal, ce seuil est principalement médié par les claudines des jonctions serrées laissant passer de petites

molécules (ions, solutés non chargés) inférieures à 8 Å, de manière très sélective selon leur charge. Toutefois, de nombreux stimuli peuvent déclencher une contraction du cytosquelette d'actine ou une relocalisation des protéines ZO et Occludines ayant pour effet l'ouverture de ces jonctions. Ceci peut permettre le passage de molécules bien plus grosses allant jusqu'à 100 Å [98]. Dans certaines conditions pathologiques, des lésions de la barrière épithéliale peuvent même aboutir au passage d'éléments luminaux de manière incontrôlée, conduisant par exemple à la translocation de microorganismes ou de leurs dérivés vers le milieu intérieur.

La perméabilité paracellulaire et transcellulaire d'un épithélium peut être évaluée expérimentalement en mesurant le passage de molécules fluorescentes de tailles variables à travers la monocouche épithéliale (FITC-dextran de 4 kDa pour la voie paracellulaire ou 40 kDa pour la voie transcellulaire) ou en mesurant sa résistance au passage d'un courant électrique (résistance électrique transépithéliale).

b) Ségrégation du microbiote : la composante sécrétoire apicale de la barrière épithéliale intestinale

Outre la capacité intrinsèque des cellules épithéliales à former une barrière physique, l'épithélium intestinal sécrète un ensemble de facteurs qui maintiennent le gros du contenu luminal à distance du tissu intestinal (Figure 11).

Le tractus gastrointestinal est recouvert d'une couche de mucus qui assure la première ligne de défense de l'organisme face aux éléments luminaux potentiellement délétères. Il représente une barrière physique et lubrifie le conduit intestinal tout en permettant la diffusion des macromolécules et nutriments jusqu'à l'épithélium. De manière intéressante, la structure du mucus n'est pas continue le long du tractus digestif. L'intestin grêle par exemple, lieu de l'absorption des nutriments, n'est recouvert que par une fine couche de mucus discontinue et relativement perméable [99]. En revanche, dans l'estomac et le colon, respectivement exposés à une forte présence microbienne et un pH acide, la présence d'une épaisse double couche de mucus est décrite. La couche la plus externe est généralement décrite comme relativement lâche et perméable aux macromolécules. Dans le colon, elle représente même une niche pour certaines communautés bactériennes qui l'utilisent comme substrat [49]. La couche la plus interne est quant à elle dense et imperméable aux

microorganismes [100]. Le concept, selon lequel l'épithélium colique serait constamment recouvert de mucus a récemment été remis en question par Kamphuis et collègues. En utilisant des approches d'hybridation *in situ* et de colorations histologiques, les auteurs ont rapporté que dans le colon distal de souris, le mucus ne recouvrait pas la muqueuse mais uniquement les fèces, empaquetant les bactéries lumineales par la même occasion. De plus, dans les zones dépourvues de fèces, aucune couche de mucus n'a été observée, permettant même un contact direct entre les bactéries lumineales et l'épithélium [101].

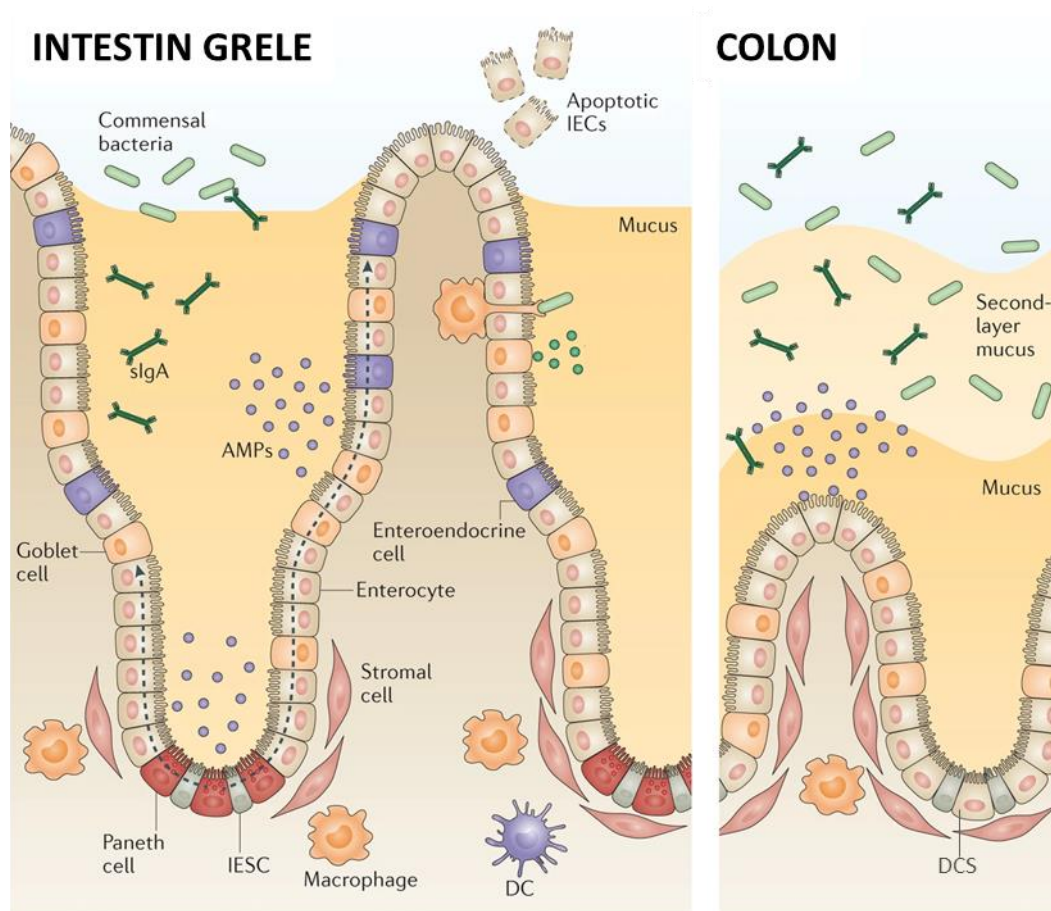


Figure 11: les acteurs sécrétés de la barrière épithéliale intestinale.

L'épithélium intestinal joue un rôle-clé dans la ségrégation du microbiote grâce à la sécrétion d'un certain nombre de facteurs représentés sur ce schéma. AMPs : Anti-microbial peptides (peptides anti-microbiens) ; sIgA (IgA sécrétoires) ; mucus. IESC : intestinal epithelial stem cell ; DCS : deep crypt secretory ; IECs : intestinal epithelial cells. Figure adaptée de Peterson et Artis, 2014 [102].

Le mucus est un hydrogel formé à plus de 90% d'eau et structuré par de longues protéines hautement glycosylées de la famille des mucines [96]. On distingue deux types de mucines :

- **Les mucines sécrétées**, qui sont produites par les cellules caliciformes. Elles forment de longs polymères qui décrivent un maillage de densité variable en fonction des segments intestinaux. La plus abondante d'entre elles est la mucine 2 (MUC2), qui est le composant majoritaire des couches intestinales décrites précédemment.
- **Les mucines transmembranaires**, dont MUC3, MUC12 et MUC17 sont exprimées par les entérocytes et les cellules caliciformes. Elles forment un revêtement à la surface de l'épithélium nommé glycocalyx [99], [103].

En plus de sa fonction de barrière physique, le mucus contient un grand nombre de produits de sécrétion des cellules épithéliales qui participent à la ségrégation des microorganismes à distance de la muqueuse. Les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules de Paneth produisent notamment de nombreux peptides antimicrobiens dont les défensines (α et β -défensine), cathélicidines et lectines de type C (RegIII). Ces peptides exercent une action bactéricide contrôlant la pénétration du mucus par les bactéries et ont également des rôles immunomodulateurs importants [102], [104].

Enfin, d'importantes quantités d'immunoglobulines A et M sécrétées (sIgA, sIgM) sont retrouvées à la surface de l'épithélium intestinal. En se liant aux antigènes et microorganismes, elles favorisent leur clairance et participent à la ségrégation immunitaire [105].

1.4.3. L'épithélium intestinal : un médiateur entre les microorganismes luminaux et l'immunité de l'hôte

La lumière intestinale, en particulier dans le colon, héberge de nombreux microorganismes dont certains sont importants pour l'homéostasie intestinale, alors que d'autres peuvent présenter une certaine pathogénicité. En conséquence, l'épithélium intestinal est doté de nombreux systèmes capables de détecter les microorganismes luminaux et de contrôler les réponses immunitaires de l'hôte.

Les cellules épithéliales intestinales sont dotées de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors ou PRR). Ces récepteurs reconnaissent des composants caractéristiques des microorganismes appelés « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMP). Les PRRs sont divisés en plusieurs familles : les Toll-like récepteurs (TLR), NOD-like récepteurs (NLR) et RIG-like récepteurs (RLR). Les différents membres de ces familles peuvent reconnaître des PAMP variés, offrant un pouvoir de reconnaissance extrêmement large des microorganismes. La reconnaissance d'un PAMP par un PRR entraîne l'activation de voies de signalisation intracellulaires régulant de nombreuses fonctions cellulaires. Contrairement à certaines idées reçues, l'activation des PRR n'aboutit pas uniquement à des effets pro-inflammatoires et de nombreuses études ont montré que ces récepteurs jouent un rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire et la tolérance immunitaire [102]. Ainsi, les effets médiés par ces récepteurs sont pléiotropes : production de cytokines et autres médiateurs immunitaires, survie et prolifération cellulaire, sécrétion de mucus et de peptides antimicrobiens, régulation de la perméabilité paracellulaire.

1.4.4. Fonction de sécrétion basolatérale

En plus de la sécrétion de facteurs protecteurs du côté apical décrite précédemment, les cellules épithéliales intestinales entretiennent également un dialogue étroit avec le microenvironnement tissulaire via leurs sécrétions basolatérales.

Les cellules entéro-endocrines du tractus gastro-intestinal forment l'un des plus importants organes endocrines de l'organisme. Le type d'hormones produites par ces cellules varie selon leur localisation le long du tube digestif et régule de nombreux processus physiologiques. Les cellules de type L par exemple, surtout présentes dans l'intestin grêle et le colon, sont capables de produire du Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1). Cette molécule est libérée dans la circulation sanguine en réponse à un repas (par les lipides et glucides alimentaires). L'une des principales fonctions décrite pour le GLP-1 est un effet incrétine, régulant la balance énergétique de l'organisme en stimulant la production d'insuline par les îlots pancréatiques [106].

Outre les sécrétions hormonales par les cellules entéro-endocrines, de nombreuses cellules épithéliales sécrètent des interleukines (IL-6, CX-CL8, IL-10, IL-33) qui jouent un rôle

important dans le contrôle des réponses immunitaires. Elles agissent aussi de manière autocrine en régulant notamment la prolifération, l'apoptose ou encore la fonction barrière des cellules épithéliales [107]. Enfin, comme précédemment décrit, les cellules Tuft peuvent produire de l'IL-25 en réponse à une infection parasitaire, ce qui participe à la mise en place de la réponse Th2 anti-helminthe [59].

1.5. L'épithélium gastrique

Tout comme l'intestin, l'estomac est recouvert d'un épithélium simple prismatique. Cependant, contrairement à l'intestin, l'estomac n'a qu'un rôle absorbant mineur et sa fonction est plutôt dirigée vers la sécrétion de molécules à visée digestive et protectrice de la muqueuse. Par conséquent, l'organisation et la composition cellulaire de l'estomac diffèrent de celle de l'intestin. La surface de l'épithélium gastrique est relativement plane et recouverte de cellules muqueuses superficielles (ou cellules foveolaires) permettant la formation d'une épaisse couche de mucus à l'interface entre l'épithélium et le contenu luminal [108]. L'épithélium gastrique présente aussi de profondes invaginations tubulaires dans la *lamina propria* formant des fosses (Figure 12). Ces fosses sont prolongées par des glandes nommées « glandes gastriques ». Les glandes gastriques peuvent être segmentées en trois régions de la partie la plus superficielle de l'épithélium à la plus profonde :

- La région qui assure la jonction avec la fosse est nommée **isthme**, elle comporte un rétrécissement de la lumière glandulaire.
- La **région du cou**, dans laquelle la lumière s'élargit progressivement.
- La **base des glandes**, présentant une cavité luminale plus large.

Contrairement à l'Homme, chez la souris l'estomac peut être divisé en deux parties distinctement visibles à l'œil nu. Les deux tiers supérieurs de l'estomac murin, aussi appelés pré-estomac, sont occupés par un épithélium squameux kératinisé ne présentant pas de glandes gastriques. L'épithélium de la partie inférieure de l'estomac composée du corps et de l'antrum pylorique ressemble en revanche tout à fait aux régions humaines correspondantes [109].

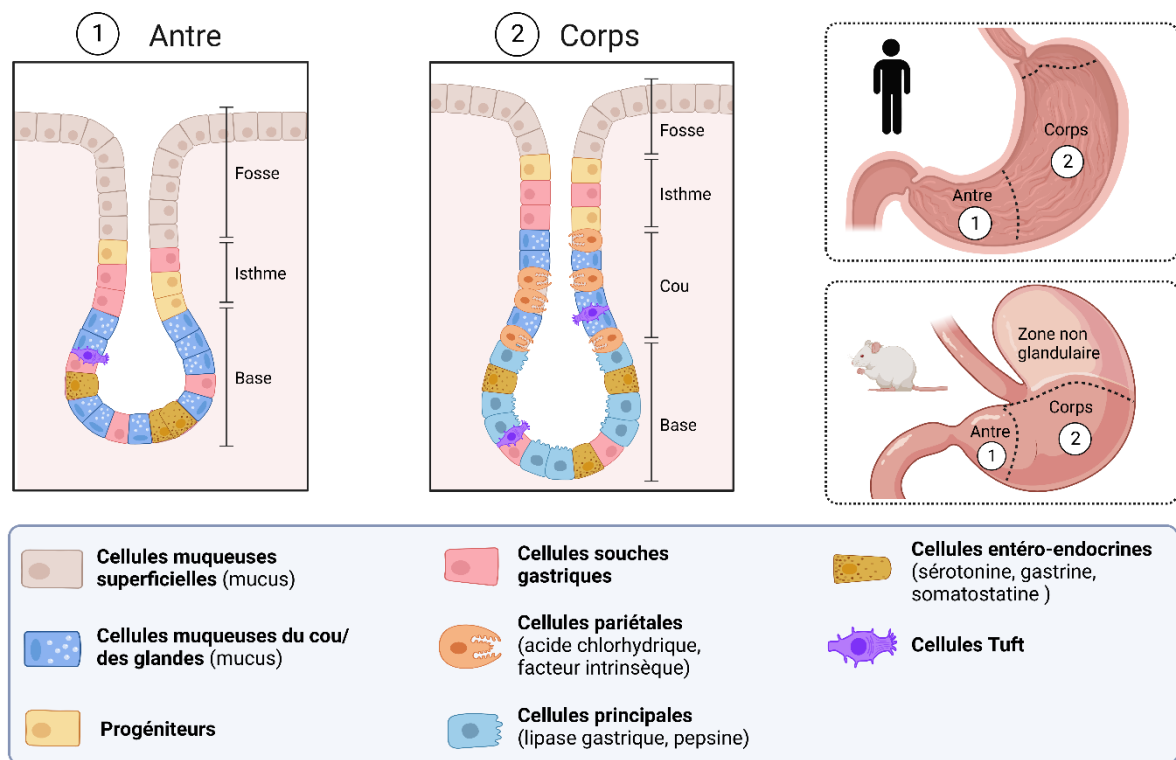


Figure 12: architecture et composition cellulaire de l'épithélium gastrique.

Représentation des différentes régions composant l'épithélium gastrique dans l'antre ou le corps de l'estomac. Les cellules épithéliales présentes dans ces zones sont schématisées. Figure créée avec Biorender.com.

a) Glandes gastriques et cellules souches

A l'image des cryptes intestinales, les glandes gastriques représentent l'unité fonctionnelle de l'épithélium gastrique contenant des cellules souches qui se différencient en cellules spécialisées tout en migrant. Cependant, l'identité et le modèle de différenciation des cellules souches de l'estomac reste encore grandement débattus. Le schéma le plus généralement accepté veut que les cellules souches actives de l'estomac soient localisées au niveau de l'isthme des glandes gastriques [110]. Ces cellules expriment le marqueur *Bmi1* et forment des progéniteurs qui peuvent migrer soit vers la surface de l'épithélium soit vers le fond des glandes, générant des types cellulaires matures différents [111]. Il faut toutefois noter que de nombreuses études de traçages génétiques ont aussi identifié des populations cellulaires présentant des caractéristiques de cellules souches à la base des glandes gastriques [112], [113]. La nature exacte de ces cellules reste à l'heure actuelle grandement débattue dans la littérature.

b) Les cellules gastriques différenciées

La composition cellulaire des glandes varie selon les régions anatomiques de l'estomac, déterminant les fonctions respectives de ces régions. On retrouve six types cellulaires différenciés dans l'estomac [108] :

Les cellules muqueuses superficielles (ou cellules fovéolaires superficielles) : tapissent la lumière de l'estomac. Elles sécrètent un mucus épais et visqueux qui forme une couche protectrice contre les effets corrosifs des sucs gastriques, contribuant ainsi à prévenir l'autodigestion de la muqueuse gastrique.

Les cellules muqueuses du cou : ont aussi pour fonction la production de mucus. Elles sont présentes en grappes ou sous forme de cellules individuelles parmi les autres cellules du cou et sont retrouvées dans les glandes fundiques et du corps de l'estomac. Elles dérivent directement de la migration des cellules progénitrices de l'isthme en direction de la base des glandes. Elles sont absentes au niveau du pylore où sont présentes d'autres cellules à mucus (les cellules muqueuses des glandes).

Les cellules pariétales : sont présentes parmi les cellules muqueuses du cou et dans les parties plus profondes des glandes fundiques et du corps de l'estomac. Elles produisent de l'acide chlorhydrique qui participe à la digestion des aliments. Les cellules pariétales sécrètent également le facteur intrinsèque, une glycoprotéine nécessaire à l'absorption de la vitamine B12 dans l'intestin grêle.

Les cellules principales : sont uniquement présentes dans les régions fundiques et du corps de l'estomac où elles sont essentiellement retrouvées dans la zone basale. Elles sécrètent des enzymes digestives dont la lipase gastrique et la pepsine, une protéase active à pH acide. En plus de leur rôle sécrétoire les cellules principales sont aussi considérées comme des cellules souches de réserve de l'estomac. En effet, certaines sous-populations de ces cellules exprimant des marqueurs tels que Lgr5 ou Troy ont la capacité de régénérer entièrement l'épithélium glandulaire lors de dommages tissulaires [114], [115].

Les cellules entéro-endocrines : décrites précédemment dans la section relative à l'épithélium intestinal (section 1.3.2). Parmi elles on retrouve des cellules entérochromaffines productrices de sérotonine, des cellules productrices de gastrine (G) qui stimule la sécrétion

d'acide chloridrique ou encore des cellules de type D produisant de la somatostatine qui régule la sécrétion de nombreux organes exocrines et endocrines [106].

Des cellules Tuft : dont le rôle a déjà été décrit pour l'épithélium intestinal sont aussi retrouvées au sein de l'épithélium gastrique (section 1.3.2) [116].

1.6. Le microbiote intestinal

La lumière intestinale, en particulier dans le colon, n'est pas seulement un lieu de passage du bol alimentaire mais représente une véritable niche écologique, hébergeant des communautés microbiennes complexes. L'ensemble de ces microorganismes, comprenant des bactéries, archées, levures, virus et champignons, est regroupé sous le terme de microbiote intestinal.

Dès la naissance, le tractus gastro-intestinal est progressivement colonisé par de nombreux microorganismes dont la nature et l'abondance vont évoluer au cours des premières années de l'individu, jusqu'à parvenir à une relative stabilité à partir de 2-3 ans [117]. La complexité de cet écosystème est telle qu'à l'âge adulte, certaines études ont évalué que le nombre total de bactéries chez un individu pourrait égaler celui de ses propres cellules [118]. La présence des microorganismes diffère considérablement d'un segment à l'autre du tube digestif en fonction de la disponibilité en nutriments, en oxygène et la présence de facteurs de défense de l'hôte (Figure 13). Elle est relativement faible dans l'estomac où le pH luminal est acide (10^3 - 10^4 bactéries/ml de contenu), mais augmente dans l'intestin grêle (10^4 - 10^8 bactéries/ml). Elle atteint un pic dans le colon (10^{11} bactéries/ml) où prédominent des espèces anaérobies, dégradant les fibres alimentaires [118], [119].

Au sein de ces organes, les bactéries peuvent exister sous formes planctoniques isolées mais la grande majorité vit sous forme de biofilms : des communautés complexes incorporées dans une matrice extracellulaire et adhérentes à la muqueuse ou au contenu luminal [120]. Au sein de ces communautés, les bactéries sont en étroites interactions avec l'hôte et la plupart d'entre elles entretiennent des relations commensales (les bactéries tirant un bénéfice de la niche intestinale sans affecter l'hôte), voire symbiotiques avec celui-ci (si un profit réciproque existe entre les deux partis).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

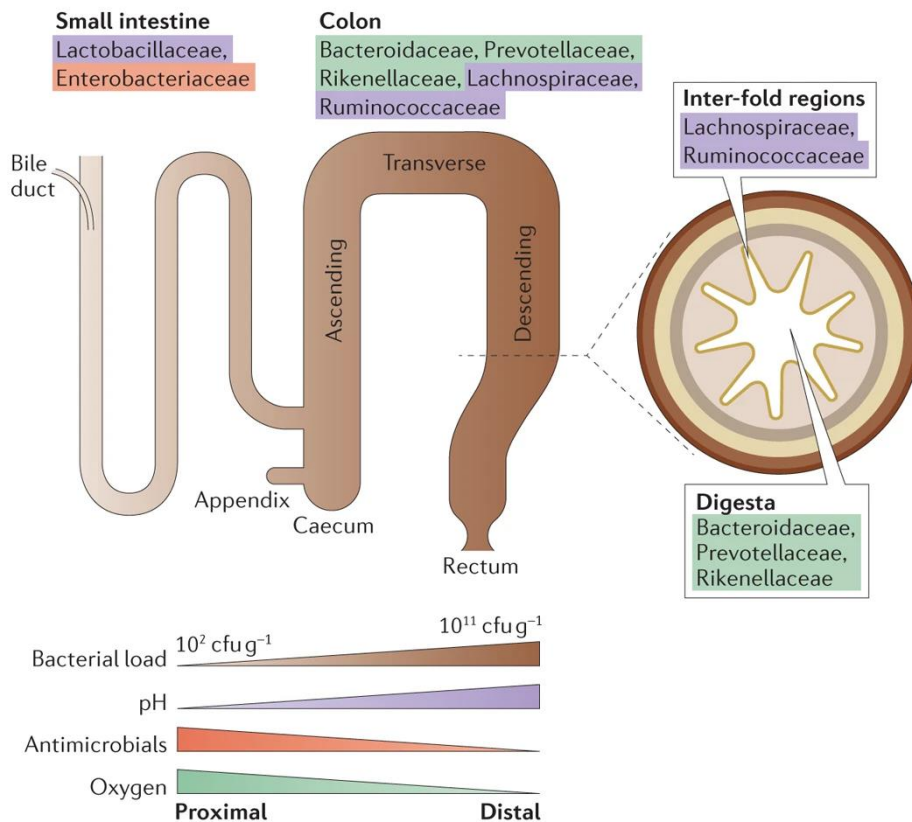


Figure 13: composition du microbiote le long du tractus digestif.

Figure issue de Donaldson, Lee, et Mazmanian 2016 [119].

Chez l'Homme, les quatre phyla bactériens majoritaires sont les *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Protéobactéries* qui représentent plus de 90% des espèces bactériennes intestinales. L'abondance relative de leurs espèces est très variable d'un individu à l'autre et il est donc difficile de définir avec précision la composition d'un microbiote « standard » physiologique [121]. Malgré cette grande diversité, il peut exister une certaine redondance fonctionnelle entre différentes familles, genres ou espèces bactériennes et le microbiote assure ainsi des fonctions essentielles à la vie de l'hôte.

L'un des rôles les mieux caractérisés du microbiote colique est un rôle métabolique. Certains de ces membres dont des *Bacteroidetes* et *Firmicutes* ont par exemple la capacité de dégrader les glucides complexes, indigestibles par l'organisme humain, en Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC). Les AGCC peuvent ensuite être absorbés par les colonocytes pour

lesquels ils constituent un substrat métabolique de choix [122]. La formidable diversité des bactéries commensales crée aussi une compétition pour l'accès à l'espace et aux nutriments qui limite la colonisation potentielle de l'intestin par des pathogènes. En dehors des aspects métaboliques, la présence du microbiote est indispensable à la maturation de la muqueuse et du système immunitaire entérique. Les souris axéniques présentent notamment une perméabilité intestinale augmentée, une diminution du renouvellement épithélial et des microvillosités épithéliales raccourcies [123], [124]. Chez ces souris, une réduction de la taille et du nombre de GALT, ainsi que des populations lymphocytaires intestinales ont aussi été rapportées. Ce dernier paramètre pouvant être corrigé par une recolonisation ultérieure [123], [125]. Ensemble, ces éléments reflètent non seulement le rôle majeur du microbiote dans l'homéostasie intestinale mais également les interactions complexes qui la soutiennent.

1.7. Pathologies du tractus digestif : les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

Les notions résumées dans les parties précédentes introduisent l'idée que de multiples acteurs coopèrent au sein du tractus gastro-intestinal afin de maintenir son intégrité et sa fonctionnalité. Cependant, de nombreuses conditions peuvent amener un ou plusieurs de ces composants à dysfonctionner, ce qui peut déstabiliser l'ensemble de l'homéostasie intestinale et conduire à des états pathologiques. L'épithélium intestinal, à l'interface entre l'environnement luminal et tissulaire de l'intestin, joue un rôle important dans les pathologies intestinales. Dans cette partie, nous passerons en revue comment l'écosystème intestinal peut être altéré en condition inflammatoire, en suivant l'exemple des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

1.7.1. Présentation générale et épidémiologie des MICI

Dans l'histoire de la médecine moderne, des cas d'inflammation persistante et inexplicable du tube digestif ont été rapportés à de nombreuses reprises depuis le XIX^{ème} siècle [126]. L'évolution des connaissances et des techniques exploratoires ont depuis mené à la classification d'un groupe de pathologies nommées : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Le terme de MICI regroupe la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), deux pathologies caractérisées par une inflammation chronique de la paroi digestive avec une étiologie complexe, menant à une réaction inflammatoire disproportionnée et persistante [127]. Ces pathologies évoluent par des phases de poussées inflammatoires alternées de phases de rémission dont la durée, la fréquence et l'intensité varient énormément d'un patient à l'autre.

Avec une prévalence mondiale qui ne cesse d'augmenter depuis les années 1990, les MICI représentent un véritable enjeu de santé publique [128]. En 2019, certains auteurs estimaient qu'environ 4,9 millions de personnes étaient touchées par ces maladies à travers le monde [55]. Les études épidémiologiques récentes pointent les composantes socio-économiques et les changements de mode de vie rapides au sein des populations comme des facteurs importants dans le développement des MICI. En effet, bien que les pays industrialisés

(Europe de l’Ouest, Amérique du Nord) connaissent la plus forte prévalence, ce sont les pays émergents qui présentent les taux d’incidence les plus forts au niveau mondial (Figure 14) [128].

En 2019, l’Assurance Maladie ne dénombrait pas moins de 273 000 personnes prises en charge pour des MICI en France, avec un coût estimé à plus d’1 milliard d’euros (source : registre Epimad). Ces données épidémiologiques, combinées aux limites des thérapeutiques actuelles ciblant principalement la symptomatologie font des MICI l’un des sujets de recherche les plus importants de la gastroentérologie moderne.

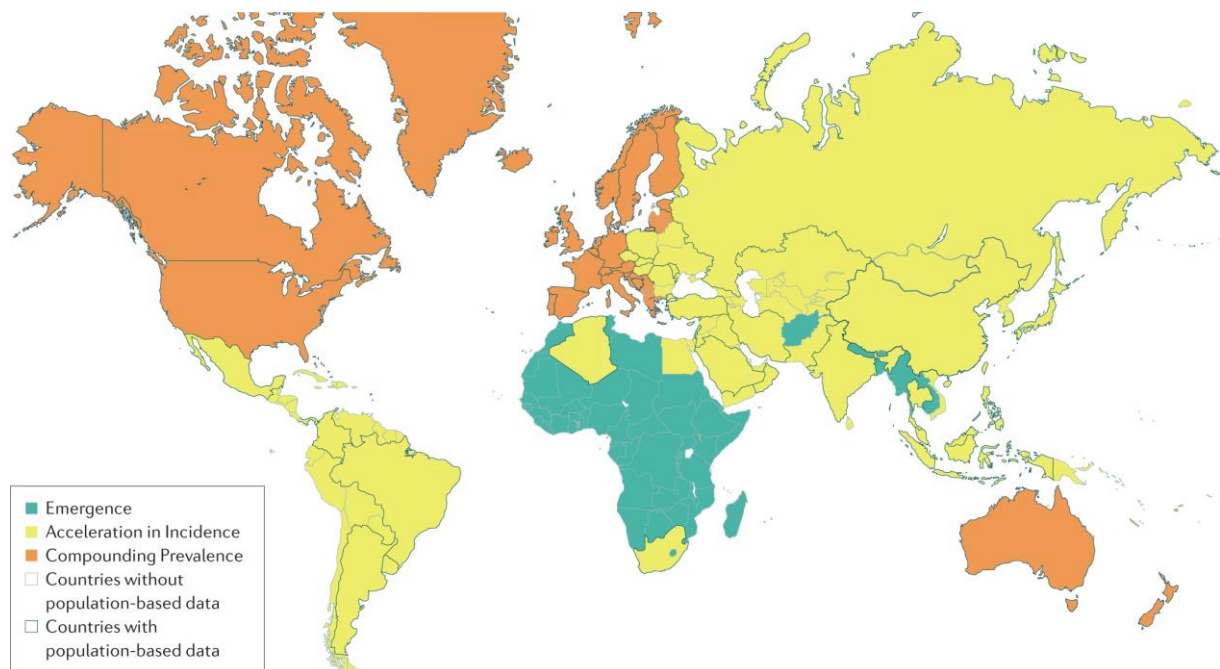


Figure 14: classification de l’incidence des MICI à travers le globe, proposée par Kaplan et Windsor, 2021.

Dans cette étude les auteurs proposaient trois stades épidémiologiques d’évolution de l’incidence [128] :

- Phase 1 « Emergence » (en vert) : concerne les régions où des cas sporadiques commencent à apparaître dans une population.
- Phase 2 « Acceleration in Incidence » (en jaune) : région dans laquelle une augmentation spectaculaire du nombre de cas incidents est observée, mais où la prévalence globale reste faible.
- Phase 3 « Compounding Prevalence » (en orange) : les taux d’incidence se stabilisent, mais la pente de la prévalence continue de s’accroître en raison de décennies d’incidence élevée avec une faible mortalité.

1.7.2. La rectocolite hémorragique

La RCH ou colite ulcéreuse a été la première MICI à avoir été identifiée. Le terme colite ulcéreuse a été utilisé pour la première fois en 1859 par Samuel Wilks dans la description d'un cas clinique ayant entraîné la mort d'une patiente à la suite de diarrhées et d'une inflammation intestinale d'origine inconnue [129]. En France, la RCH est principalement diagnostiquée chez des sujets jeunes entre 15 et 30 ans, avec une incidence légèrement plus faible que la MC [130]. Un second pic de fréquence est observé après 50 ans. Un déséquilibre de la balance homme-femme au sein des populations touchées n'est pas clair [131].

La symptomatologie de la RCH est inhomogène et se décrit par d'importantes douleurs, souvent localisées dans la partie inférieure gauche de l'abdomen et des diarrhées parfois accompagnées de saignements anaux [132]. L'aggravation des symptômes, souvent associés à un arrêt de l'alimentation, peut entraîner une hospitalisation. D'un point de vue histologique, la RCH est caractérisée par une inflammation et des lésions localisées spécifiquement aux niveaux colique et rectal. Ces atteintes sont continues le long de la zone lésée et restent superficielles (elles n'atteignent que la muqueuse) [131]. En l'absence de marqueur unique, le diagnostic de la RCH se fait sur la base d'un faisceau d'examen cliniques, biologiques, endoscopiques et histologiques [131]. L'examen clinique inclut : étude de l'historique du patient, évaluation des symptômes, de la fréquence et de l'aspect des selles. Après l'élimination d'une piste d'origine infectieuse, la recherche de marqueurs d'inflammation tels que la protéine C réactive (CRP) sanguine et la calprotectine fécale peut être effectuée malgré leur faible spécificité. L'examen endoscopique est la référence pour le diagnostic des MICI et peut également permettre de distinguer la RCH de la MC (Figure 15). Dans le cas de la RCH, une attention particulière est portée à la recherche de lésions continues au niveau colique et rectal [133]. L'endoscopie est souvent couplée à une analyse anatomopathologique après prélèvement de biopsies [134], [135].

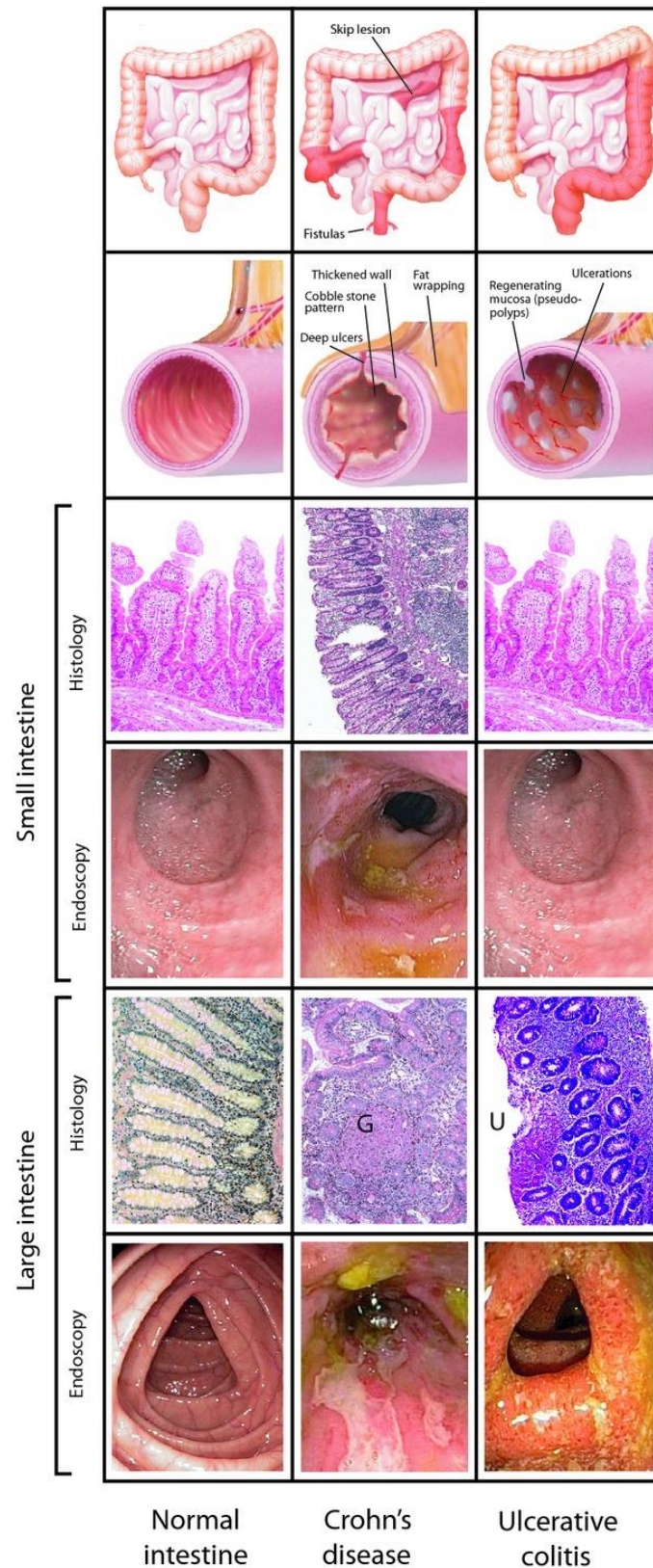


Figure 15: caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des MICI.

Comparaison des atteintes typiques observées par endoscopie et histologie entre des patients atteints de la MC (colonne centrale) ou de la RCH (colonne de droite). Légende : Small intestine : intestin grêle ; Large intestine : colon ; Crohn's disease : Maladie de Crohn ; Ulcerative Colitis : Rectocolite Hémorragique. Figure issue de Marsal et Agace 2012 [136].

1.7.3. La maladie de Crohn

Même si des cas ressemblants ont été rapportés depuis de nombreux siècles, l'identification de la MC comme une pathologie à part entière est attribuée à un article de 1932 publié par l'équipe de Burrill B. Crohn [137], [138]. Tout comme la RCH, la MC évolue par des phases successives de poussées et de rémissions et survient le plus souvent chez des individus jeunes, avec une légère prédominance de femmes [139]. Ses symptômes sont proches de la RCH avec des douleurs abdominales, diarrhées et parfois de la fièvre. Néanmoins, les atteintes de la MC peuvent être retrouvées tout au long du tractus digestif (de la bouche à l'anus), même si plus de 90 % des cas concernent l'iléon et le colon [140]. L'étude coopérative européenne sur la maladie de Crohn (ECCDS) rapportait que sur plus de 450 patients étudiés, 49 % présentaient une atteinte combinée de l'intestin grêle et du gros intestin. De plus, 30 % des patients n'avaient qu'une atteinte de l'intestin grêle, alors que 21 % d'entre eux présentaient uniquement une atteinte colique [141]. Les lésions retrouvées lors de la MC sont discontinues le long de l'organe touché et profondes, pouvant même aboutir à des ulcérations complètes nommées fistules (Figure 15). D'un point de vue général, les MICI sont également associées à des risques de complication comme des sténoses (rétrécissement du diamètre luminal) et un risque accru de développement de cancer colorectal. En outre, plus de 20% des patients sont confrontés à des manifestations extra-intestinales (inflammations cutanées, articulaires, hépato-biliaires) [139].

Comme pour la RCH, le diagnostic de la MC est souvent long et repose sur la combinaison d'éléments cliniques, biologiques, endoscopiques et histologiques. Le diagnostic endoscopique différentiel avec la RCH suppose une exploration totale de la zone iléo-caecale et s'appuie surtout sur la présence d'atteintes discontinues et de fistules [133]. Un examen d'imagerie peut aussi accompagner l'endoscopie (entéro-IRM, échographie).

1.7.4. Etiologie des MICI

Bien que les événements exacts qui déclenchent la survenue des MICI restent méconnus, la bibliographie s'accorde sur l'existence d'un schéma général dans lequel survient une réponse immunitaire inappropriée aux microorganismes intestinaux, chez un individu génétiquement prédisposé.

a) Composante génétique

Les premières évidences d'une composante héréditaire dans les MICI sont venues d'études familiales montrant une prévalence plus importante de ces maladies dans les familles présentant des antécédents de MICI [134]. L'avènement des études d'association pangénomique (GWAS) a depuis permis d'identifier plus de 200 loci génétiques dont les mutations sont associées à une augmentation du risque de survenue des MICI [142]. La plupart de ces mutations sont autant associées avec le développement de la MC que de la RCH.

L'un des exemples les plus connus et le premier à avoir été identifié pour la MC est le gène NOD2 [143]. On estime que 30 à 50% des patients MC seraient porteurs de mutations au niveau de ce gène [144]. Ce gène code un récepteur PRR intracellulaire de la famille NOD-like impliqué dans la détection des agents bactériens et l'activation des mécanismes de défense cellulaire (production de cytokines, autophagie).

Au global, l'analyse fonctionnelle des gènes de prédisposition aux MICI semble pointer un rôle important de certaines fonctions telles que l'immunité innée de la muqueuse, la régulation de l'immunité adaptative ou encore la fonction de barrière épithéliale [145]. Cependant, une partie des individus porteurs des mutations évoquées ne développent pas de MICI, mettant en valeur l'implication d'autres facteurs dans la survenue de ces maladies.

b) Composante environnementale

Les facteurs environnementaux et les habitudes de vie semblent influencer grandement la survenue des MICI. La localisation géographique, les habitudes alimentaires, le tabagisme, l'exposition à certains pathogènes ou médicaments sont autant de paramètres ayant été associés à la survenue des MICI [146].

Parmi ceux-ci, l'influence du tabagisme est sans doute le facteur le plus abondamment étudié depuis les années 1980, avec des résultats opposés entre la MC et la RCH. La consommation de tabac a été associée à un effet protecteur contre la RCH, alors qu'elle augmenterait de près de deux fois le risque de MC [147], [148]. Les mécanismes précis ne sont pas clairs, mais pourraient impliquer les propriétés immunomodulatrices de la nicotine [149].

Le régime alimentaire des pays industrialisés à haute teneur en produits transformés, sucres, lipides et protéines animales a souvent été mentionné comme un facteur favorisant l'apparition des MICI [150]. Toutefois, aucun consensus dans la littérature ne semble relier spécifiquement un type d'aliment au développement de ces pathologies [151].

Plusieurs facteurs associés aux premières périodes post-natales ont aussi été rapportés. Un allaitement maternel prolongé semble protecteur. En revanche, plusieurs études soutiennent qu'un excès d'hygiène pourrait conduire à une certaine immaturité du système immunitaire, le prédisposant à des réactions disproportionnées à l'âge adulte [146].

1.7.5. Physiopathologie des MICI

a) Rôle du microbiote

Un niveau de preuve croissant tend à montrer qu'une dysbiose, un déséquilibre qualitatif et quantitatif du microbiote intestinal, participerait aux événements inflammatoires des MICI (Figure 16).

Plusieurs études taxonomiques se sont accordées sur la présence d'un microbiote avec une diversité bactérienne réduite dans ces pathologies, comparativement à des individus sains [152]. En particulier, une réduction de la diversité d'organismes anaérobies stricts aux vertus bénéfiques et une augmentation d'anaérobies facultatives pathogènes semble être un schéma redondant dans la littérature. Par exemple, une diversité réduite au sein du phylum des *Firmicutes*, actif dans la production d'AGCC, a été couramment retrouvée dans les cas de MICI [153], [154]. Parmi elles, l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* semble particulièrement déplétée chez les patients atteints de MC comparé à des individus sains [155]. Cette bactérie s'est depuis avérée avoir des vertus protectrices dans des modèles animaux de colites expérimentales [156], [157]. A l'inverse, la sur-représentation des *Protéobactéries*, dont certaines souches d'*E.coli* pathogènes, sont notables chez les patients MC et RCH [158], [159]. Cependant, aucun lien de causalité directe entre une espèce bactérienne et le développement des MICI n'a été rapporté à ce jour.

Outre ces changements taxonomiques observés, un bouleversement de l'organisation spatiale des communautés bactériennes et de leur capacité de virulence est aussi associé aux

MICI. Parmi ces altérations, une augmentation de la taille des biofilms adhérents à la muqueuse, ainsi qu'une plus grande propension des bactéries à infiltrer la couche de mucus et la muqueuse ont été notées [160], [161].

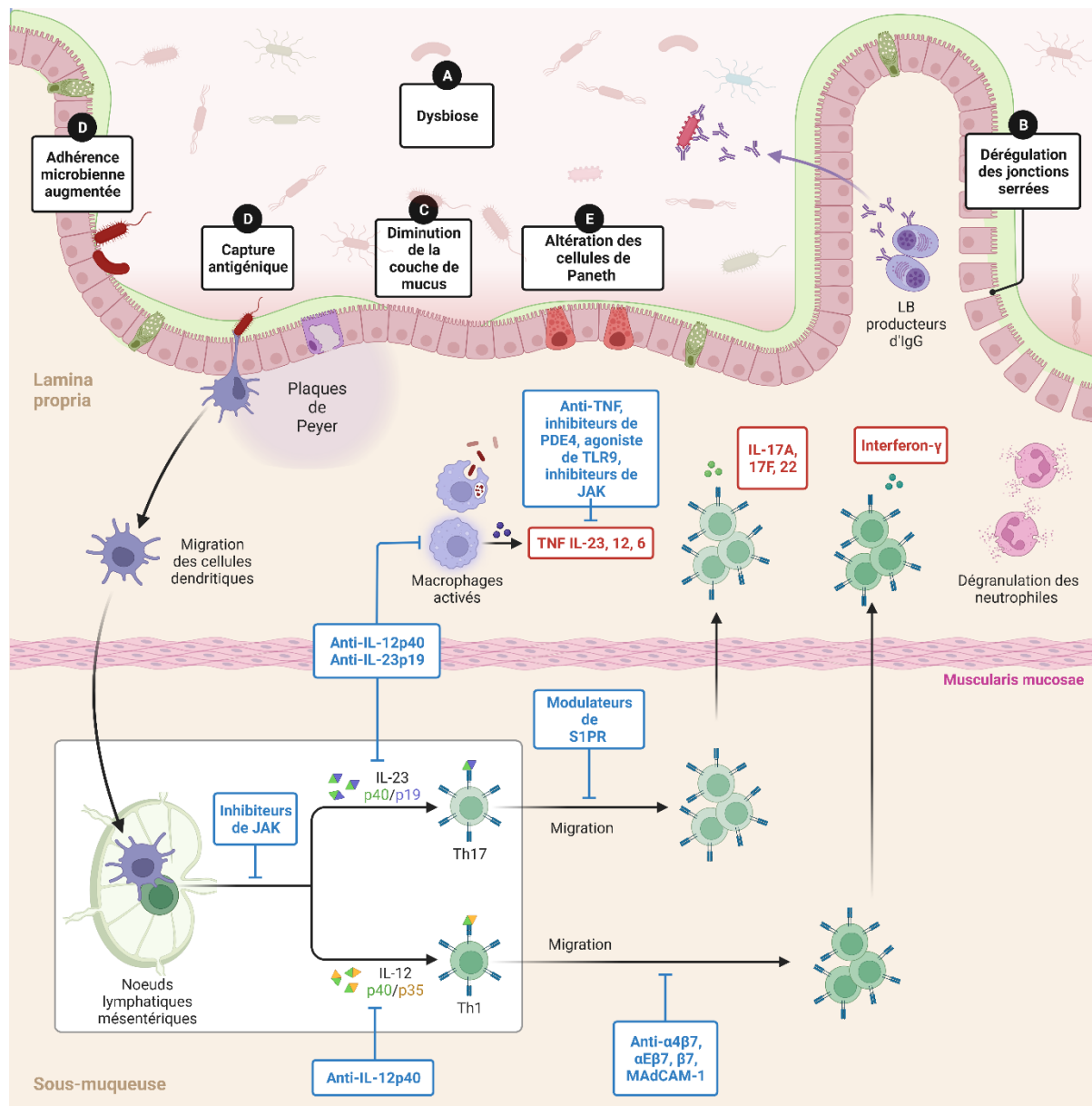


Figure 16: mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la muqueuse intestinale lors des MICI.

De nombreux processus sont dérégulés dans la muqueuse des patients atteints de MICI et sont représentés sur ce schéma. Ces altérations comprennent une dysbiose (A), un épithélium plus perméant (B, jonctions serrées plus lâches), une couche de mucus réduite (C) entraînant une adhérence accrue de certaines bactéries (D) et de la translocation, une infiltration immunitaire accrue et des réponses immunes exacerbées et chroniques vis-à-vis d'antigènes luminaux (D). Les différentes cibles pharmacologiques utilisées dans l'arsenal thérapeutique des patients MICI sont indiquées en bleu. Elles visent toutes à réduire l'inflammation en ciblant différentes facettes de l'immunité. LB : lymphocytes B. Figure adaptée de Chang 2020 [162] et créée avec Biorender.com.

De plus amples évidences de l'importance du microbiote dans le développement de MICI sont venues de l'utilisation des souris axéniques (dépourvues de microbiote). Les souris axéniques présentant des fonds génétiques de susceptibilité (IL10^{-/-}), ne développent pas de colite contrairement aux animaux colonisés [163]. De plus, le transfert de microbiotes issus de patients souffrant de MICI augmente la susceptibilité des souris axéniques à développer une colite, comparé au transfert de microbiotes issus d'individus sains [164]. Ces données indiquent donc que l'apparition d'un microbiote dysbiotique pourrait être l'une des causes primaires des atteintes retrouvées dans les MICI.

b) Implication des acteurs tissulaires et moléculaires de l'hôte

Du côté de l'hôte, la physiopathologie des MICI met en jeu une réponse immunitaire exacerbée vis-à-vis du contenu luminal, associée à une défaillance de la barrière épithéliale, chacun de ces phénomènes s'alimentant respectivement et participant à la chronicité de ces maladies (Figure 16).

Réaction immunitaire disproportionnée :

La réaction inflammatoire fait normalement suite à une agression de l'organisme d'origine diverse (infectieuse, chimique, blessure physique). Pour répondre à ces agressions le système immunitaire met en jeu des mécanismes rapides de réactions dites « innées », qui sont non spécifiques et qui précèdent des réactions adaptatives spécifiques. Dans la muqueuse intestinale, ces réactions immunitaires doivent être équilibrées entre une protection efficace contre les pathogènes et une certaine tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et des microorganismes commensaux.

Une réponse immunitaire innée dérégulée est retrouvée lors des MICI. Elle est notamment caractérisée par une suractivation des récepteurs PRR qui sont exprimés à la surface des cellules épithéliales et des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages) [165]. Cette signalisation accrue pourrait conduire à une perte de la tolérance immunitaire et à la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que le Facteur de Nécrose Tumorale α (TNF α), ou certaines interleukines (IL-12, IL-18, IL-23, IL-1 β) [165].

La composante adaptative de l'immunité semble également dérégulée dans les MICI. Les lymphocytes B, responsables de la production d'IgA sécrétoires semblent d'avantage tournés vers une production d'IgG dirigées contre les organismes commensaux, plus spécifiques et plus enclines à l'activation des cellules phagocytaires [105]. Une infiltration anormalement élevée de lymphocytes T CD4+, est rapportée dans les MICI [166]. Au contact de cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-23 produites par les cellules de l'immunité innée, ces lymphocytes peuvent se différencier en sous-types Th1 et Th17. Ces sous-types semblent avoir un rôle déterminant dans les MICI en produisant des facteurs comme l'IL-17, l'interféron (IFN) et le TNF qui sont à leur tour capables d'activer les cellules de l'immunité innée, entretenant ainsi une sorte de boucle de suractivation immunitaire [162], [167].

Rupture de la barrière épithéliale :

Les phénomènes inflammatoires pourraient être la résultante ou la cause d'une autre caractéristique importante des MICI : une diminution de la fonction de barrière de l'épithélium. Cette rupture peut être observée au niveau macroscopique par les nombreuses lésions de la muqueuse présentes en phase de poussée inflammatoire, mais également au niveau cellulaire et moléculaire où les altérations épithéliales sont nombreuses.

La couche de mucus tapissant l'épithélium est primordiale pour conserver l'intégrité de la barrière. Chez les patients atteints de RCH, une déplétion des cellules caliciformes ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus a été bien documentée en phase de poussée [168]. En plus de la diminution de son épaisseur, le mucus des patients RCH semble moins dense et plus facilement pénétrable par les bactéries, probablement dû à une abondance plus faible de MUC2 [49]. Dans la MC des altérations structurelles semblables du mucus ont été retrouvées, malgré une sécrétion augmentée par rapport à des individus sains [169].

Comme exposé précédemment, la production de peptides antimicrobiens par l'épithélium est une fonction importante pour garder le microbiote à distance de la muqueuse. En ce sens, une perte d'induction des défensines est décrite dans la MC, qui semble dépendante des cellules de Paneth [170], [171].

De nombreux travaux ont rapporté une augmentation de la perméabilité paracellulaire chez des patients atteints de MICI [172]. Cette augmentation de la perméabilité peut être

médiée par une dégradation des jonctions serrées et un réarrangement de leur composition. L'expression de claudines formant des pores, telles que la claudine 2, est par exemple augmentée dans les MICI [173], [174].

Le milieu inflammatoire retrouvé dans ces pathologies est certainement un facteur important de la rupture de la barrière épithéliale lors des MICI. Pour preuve, de nombreux médiateurs immunitaires peuvent moduler les fonctions de la barrière épithéliale. Parmi ces facteurs, les cytokines produites par les cellules immunitaires mais également l'épithélium lui-même régulent la perméabilité, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose épithéliale [107]. **Tout comme les cytokines, les protéases semblent des acteurs moléculaires importants dans l'homéostasie intestinale, influençant de nombreux processus physiologiques et pathologiques [175]. Le rôle de ces enzymes protéolytiques sera discuté en détail dans le reste de ce manuscrit.**

1.7.6. Thérapeutiques des MICI

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif des MICI, les thérapeutiques actuelles se contentent de contrôler les symptômes de ces maladies. Leur objectif est principalement d'atteindre une rémission stable et prolongée des patients. La nature et la posologie des traitements varient selon le type de pathologie, son intensité, le niveau de réponse du patient et peuvent donc être modifiées selon l'évolution de la maladie. Ils permettent la plupart du temps un bon contrôle de la maladie, améliorant la qualité de vie des patients, mais présentent pour beaucoup des risques d'effets secondaires ou d'apparition de résistances à moyen et long terme. Les traitements se divisent en 3 grandes catégories : traitements anti-inflammatoires (dérivés du 5-ASA et corticostéroïdes), traitements immunosuppresseurs (thiopurines, methotrexate, inhibiteurs de calcineurine) et biothérapies ciblées (anti-TNF, anti-IL12/23 et anti-intégrines, voir Figure 16). Malgré les progrès des thérapies, une résistance aux traitements mis en place ou la survenue de complications peut justifier la nécessité d'un acte chirurgical. Cet acte consiste essentiellement à retirer la portion du tube digestif lésée en conservant au maximum les zones saines. Certaines études ont estimé que près de 70 à 80% des patients atteints de MC et 20 à 30% des patients souffrant de RCH subissent une intervention chirurgicale au cours de leur vie [176]. Le recours à la chirurgie

n'évite cependant pas les risques de récurrence et un suivi endoscopique post-opératoire des patients est nécessaire.

1.8. Modèles d'étude *in vitro* de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal assure des fonctions multiples et est en étroite interaction avec son microenvironnement *in vivo*, ce qui en fait donc un tissu difficile à étudier. Les modèles *in vitro* de cultures de cellules épithéliales intestinales sont donc indispensables pour étudier la physiologie épithéliale de manière ciblée, ainsi que ses atteintes en condition pathologique.

1.8.1. Culture de lignées épithéliales en deux dimensions

Des lignées cellulaires épithéliales immortalisées ou cancéreuses cultivées en deux dimensions (2D) sont des outils fréquemment utilisés pour modéliser l'épithélium intestinal. Ces lignées commercialement disponibles présentent plusieurs avantages dont un coût d'utilisation réduit, une relative simplicité de culture et un temps de doublement court.

Dans ce projet, nous avons utilisé la lignée murine CMT93 isolée à partir d'un adénocarcinome colorectal. Ces cellules présentent un phénotype entérocytaire avec expression d'une bordure en brosse et de complexes jonctionnels [177]. Elles présentent l'intérêt d'exprimer les Récepteurs Activés par les Protéases, qui ont fait l'objet d'une partie de notre étude et qui seront présentés dans le chapitre suivant [178]. De plus, elles sont facilement transfectables, ce qui nous a permis de générer des lignées exprimant ces récepteurs de manière différentielle.

Ce type de lignée a souvent été utilisé comme un modèle simplifié pour étudier l'action de molécules d'intérêt sur la physiologie épithéliale, la fonction barrière de l'épithélium et l'absorption de molécules thérapeutiques. De par leurs caractéristiques cancéreuses, elles présentent cependant certaines limites d'interprétation des résultats en physiologie puisque que leurs capacités adhésives et prolifératives sont dérégulées. De plus, elles ne reproduisent pas la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal et leur méthode de culture en 2D n'est pas représentatif de son architecture *in vivo*.

1.8.2. Culture de cellules primaires épithéliales en trois dimensions

Les organoïdes sont des structures cellulaires complexes générées *in vitro* qui imitent la complexité fonctionnelle, structurelle et biologique clé d'un organe donné [179]. Ils sont constitués à partir de cellules souches qui s'assemblent de manière organisée lorsqu'elles sont cultivées en trois dimensions (3D). Ces cultures peuvent être établies à partir de cellules souches pluripotentes embryonnaires ou induites (iPSC), mais aussi à partir de cellules souches adultes isolées d'un organe d'intérêt. Seul ce deuxième cas de figure sera décrit ici car il représente un des modèles d'études utilisés lors de mes travaux de thèse.

Sato *et al.* ont décrit pour la première fois en 2009 que des cryptes intestinales murines isolées et cultivées en 3D étaient capables de reformer des structures épithéliales autoorganisées, proches de l'architecture de l'épithélium *in vivo* [180]. Techniquement, ce modèle de culture repose sur l'isolement de cryptes intestinales placées en culture dans une matrice tridimensionnelle formée par un hydrogel (Matrigel®). Cet hydrogel contient des protéines de matrice extracellulaire (collagènes, laminines, protéoglycanes) essentielles à l'adhésion des cellules épithéliales. Une foisensemencées dans cette matrice et placées dans un milieu de culture complexe, les cryptes peuvent ainsi se refermer pour former des organoïdes (Figure 17). La formation de ces organoïdes repose sur les propriétés de prolifération et d'auto-renouvellement des CSI Lgr5+ [15], [180]. *In vivo*, le maintien et l'expansion des CSI est sous le contrôle des nombreux facteurs de leur niche. Une fois placées en culture dans des conditions mimant ce microenvironnement (facteurs de croissance, matrice extracellulaire), les CSI isolées prolifèrent et migrent dans la matrice jusqu'à former des structures épithéliales closes, sphériques et présentant une lumière centrale, les organoïdes.

Afin de mimer ce microenvironnement, le milieu de culture utilisé contient des facteurs essentiels de la niche des CSI comme des activateurs des voies Wnt (Wnt-3a, R-spondine) et EGF, ainsi que du Noggin (antagoniste de la voie BMP). Ces facteurs promeuvent l'auto-renouvellement et la prolifération des CSI et progéniteurs [181], [182]. Ce milieu est aussi généralement additionné d'agents anti-oxydants (N-acétylcystéine) et d'inhibiteurs de rho-kinases (Y27632, nicotinamide) qui limitent le stress oxydatif et l'apoptose cellulaire liée à leur isolement [183].

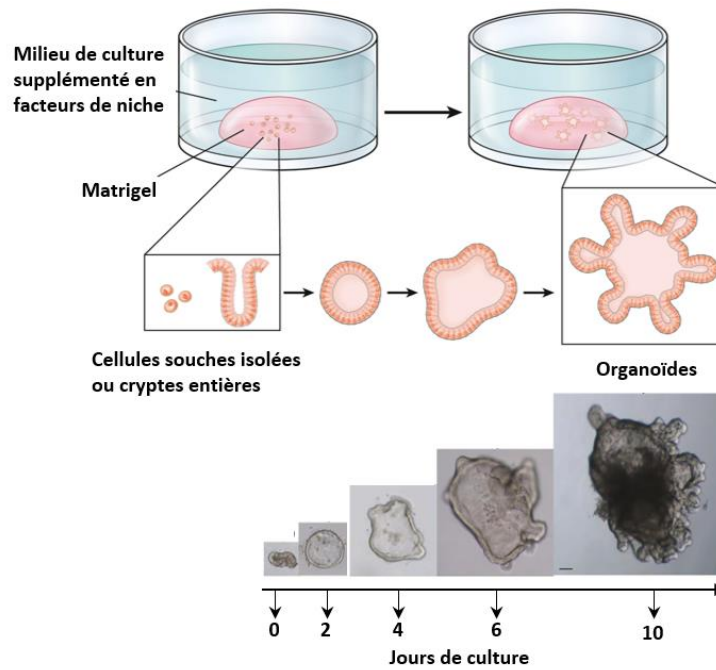


Figure 17: modèle de culture d'organoïdes intestinaux.

Schéma représentant le principe de la culture d'organoïdes. Des cryptes entières isolées à partir de tissu murin ou humain, ou des CSI isolées lors d'un passage des organoïdes sont ensemencées dans du Matrigel. Du milieu de culture contenant les facteurs de niche essentiels au maintien des cellules-souches est ajouté. Au fil du temps, les organoïdes vont se refermer puis former des structures circulaires délimitées par une monocouche de cellules épithéliales contenant une lumière centrale. Lors de leur maturation les organoïdes peuvent former des bourgeonnements correspondant à des néo-cryptes. Figure adaptée de Fujii *et al.*, 2019 et Sato *et al.* 2011 [181], [184].

En plus de l'expansion des CSI, le modèle organoïde permet aussi l'obtention d'un épithélium mature au bout de seulement quelques jours de culture, pouvant contenir la plupart des types cellulaires épithéliaux différenciés [25], [180]. Lors des premiers jours de culture la prolifération des cellules souches va former des structures sphériques immatures, composées d'une monocouche épithéliale fine et non polarisée avec une lumière centrale. Ces structures vont progressivement augmenter en taille et accomplir une maturation lors de laquelle les cellules épithéliales se polarisent et se différencient tout en maintenant un pool de CSI. Ces cellules polarisées présentent un réseau d'actine concentré à leur face apicale, située en direction de la lumière centrale. Lors de leur maturation les cellules épithéliales peuvent aussi se compartimenter, laissant apparaître des néo-cryptes (bourgeonnements) enrichies en cellules souches et progénitrices, pointant vers l'extérieur des organoïdes [181], [185].

Les organoïdes permettent donc de reproduire une topologie et une diversité cellulaire comparable à un épithélium mature. La cinétique de croissance et de maturation des organoïdes peut être facilement suivie par microscopie, études transcriptionnelles ou protéomiques. En ce sens, il s'agit d'un modèle très pertinent pour évaluer l'impact de conditions expérimentales diverses, tel que l'effet de molécules à potentiels pharmacologiques, sur la dynamique de l'épithélium intestinal [154]. Il rend aussi plus facilement possible l'étude de cellules épithéliales primaires humaines puisque des cultures peuvent facilement être mises en place à partir de pièces opératoires ou de biopsies humaines prélevés lors d'actes chirurgicaux ou exploratoires (examens endoscopiques par exemple) [181]. Enfin, la persistance *in vitro* du phénotype pathologique (empreinte) des cryptes provenant de patients MICI, fait des organoïdes un bon outil d'étude des mécanismes physiopathologiques [186].

Chapitre 2 : signalisation protéolytique dans l'intestin

Parmi les innombrables acteurs moléculaires régulant les fonctions digestives introduits au cours du chapitre précédent, les enzymes protéolytiques représentent des protagonistes majeurs de l'homéostasie intestinale. Les protéases sont des enzymes qui catalysent la réaction de clivage, par hydrolyse, des liaisons peptidiques reliant les acides aminés des protéines (Figure 18). Ces enzymes sont omniprésentes dans l'intestin comme dans tous les tissus de l'organisme, et ce, aussi bien dans le compartiment intracellulaire que dans le milieu extracellulaire. On estime d'ailleurs qu'environ 2% du génome humain (plus de 500 gènes) code des protéases [187]. Elles ont longtemps été considérées comme de simples enzymes cataboliques peu spécifiques, prenant essentiellement part à la digestion des aliments ou au recyclage des composants cellulaires. Cependant, la compréhension de leurs mécanismes d'action et de leur haute spécificité a depuis permis de mettre en exergue leur implication dans de nombreux processus physiologiques. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les mécanismes par lesquels les protéases modèlent la physiologie de la barrière intestinale.

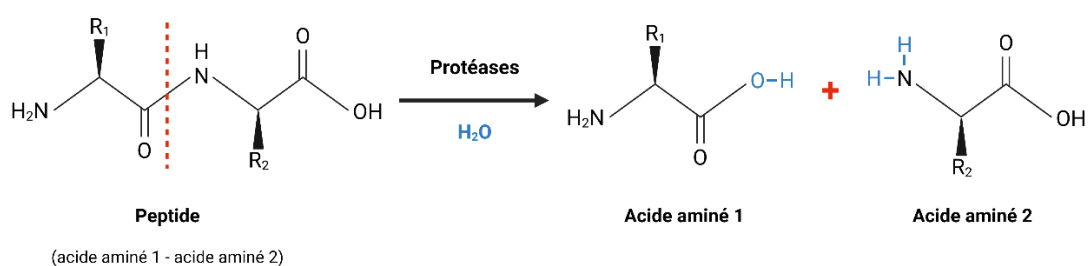


Figure 18: réaction générale d'hydrolyse des liaisons peptidiques par les protéases.

2.1. Classification et mécanismes d'action des enzymes protéolytiques

Le premier niveau de classification des enzymes protéolytiques est établi selon qu'elles clivent les acides aminés aux extrémités d'une chaîne peptidique ou à l'intérieur de cette chaîne, on parle respectivement d'exopeptidases ou d'endopeptidases.

Les protéases ont en commun l'adoption d'une structure tridimensionnelle leur permettant d'acquérir leur propriété catalytique. Ces repliements permettent la formation d'une « poche catalytique » au sein de laquelle se trouve un site actif aussi appelé site catalytique, formé par le rapprochement dans l'espace de plusieurs acides aminés qui vont interagir avec le substrat (Figure 19). Selon leur nature, les acides aminés qui composent et environnent le site catalytique des protéases leur confèrent la capacité d'interagir avec des substrats différents. Ce sont ces interactions locales qui définissent la spécificité d'une protéase envers son substrat.

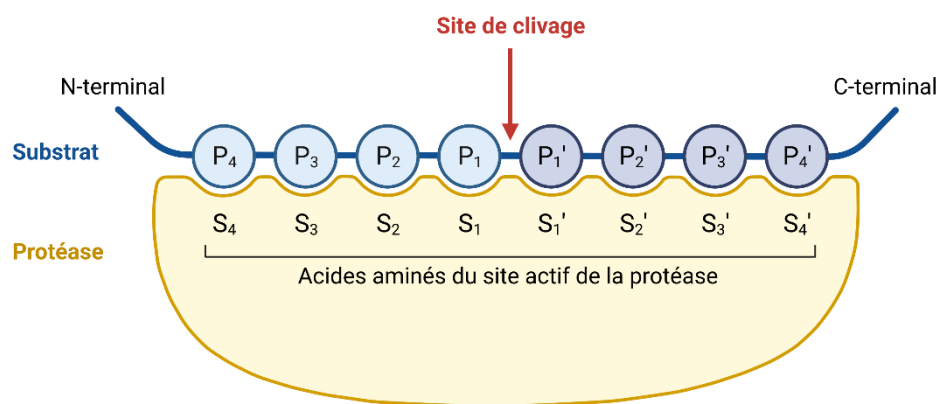


Figure 19: représentation schématique des interactions entre une protéase et son substrat protéique.

Les interactions protéases-substrats ont lieu au sein des repliements de l'enzyme (poche catalytique) qui présentent une certaine complémentarité physico-chimique avec le substrat (taille, charges, structure tridimensionnelle) et déterminent sa spécificité de reconnaissance. En son sein, les acides aminés du substrat viennent interagir avec le site actif de la protéase. Selon la nomenclature de Schechter et Berger, les acides aminés du substrat peptidique sont représentés par la lettre P et ceux de l'enzyme par la lettre S [188]. Le clivage protéolytique a lieu entre les résidus P₁ et P₁' qui interagissent avec les résidus S₁ et S₁' de la protéase. Figure inspirée de Turk 2006 [189] et créée avec Biorender.com.

Les protéases peuvent aussi être classées selon la nature du résidu impliqué dans la réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique. On distingue ainsi : les protéases à cystéine, sérine, thréonine, aspartate et les métalloprotéases. Les mécanismes catalytiques de ces différentes classes de protéases peuvent être regroupés en trois catégories différentes :

2.1.1. La catalyse covalente : les protéases à sérine, cystéine et thréonine

Le clivage protéolytique par catalyse covalente met en jeu la formation d'une liaison covalente transitoire entre l'un des acides aminés du site actif de l'enzyme et de son substrat. Les sites actifs des protéases qui catalysent cette réaction comportent 3 acides aminés responsables de l'activité de l'enzyme et qui forment une « triade » catalytique. Les acides aminés composant cette triade peuvent différer mais leurs rôles respectifs sont invariables.

La triade catalytique comporte systématiquement :

- **Un résidu nucléophile**, dont la nature (sérine, cystéine ou thréonine) donne leur nom aux trois classes d'enzymes agissant par ce mécanisme. Ces résidus sont attirés par les espèces chimiques chargées positivement, comme les atomes de carbone des liaisons peptidiques, qui portent un groupement carbonyle (C=O). Ils sont capables de leur transmettre des électrons pour former une liaison chimique, on parle d'attaque nucléophile.
- **Un résidu basique** qui active le nucléophile en lui arrachant un proton. Il peut s'agir d'acides aminés de type asparagine, histidine, ou lysine.
- **Un résidu acide**, qui polarise le résidu basique. Il s'agit souvent d'un acide aspartique ou glutamique.

Le mécanisme général d'attaque covalente est illustré en Figure 20 par la chymotrypsine, une protéase à sérine.

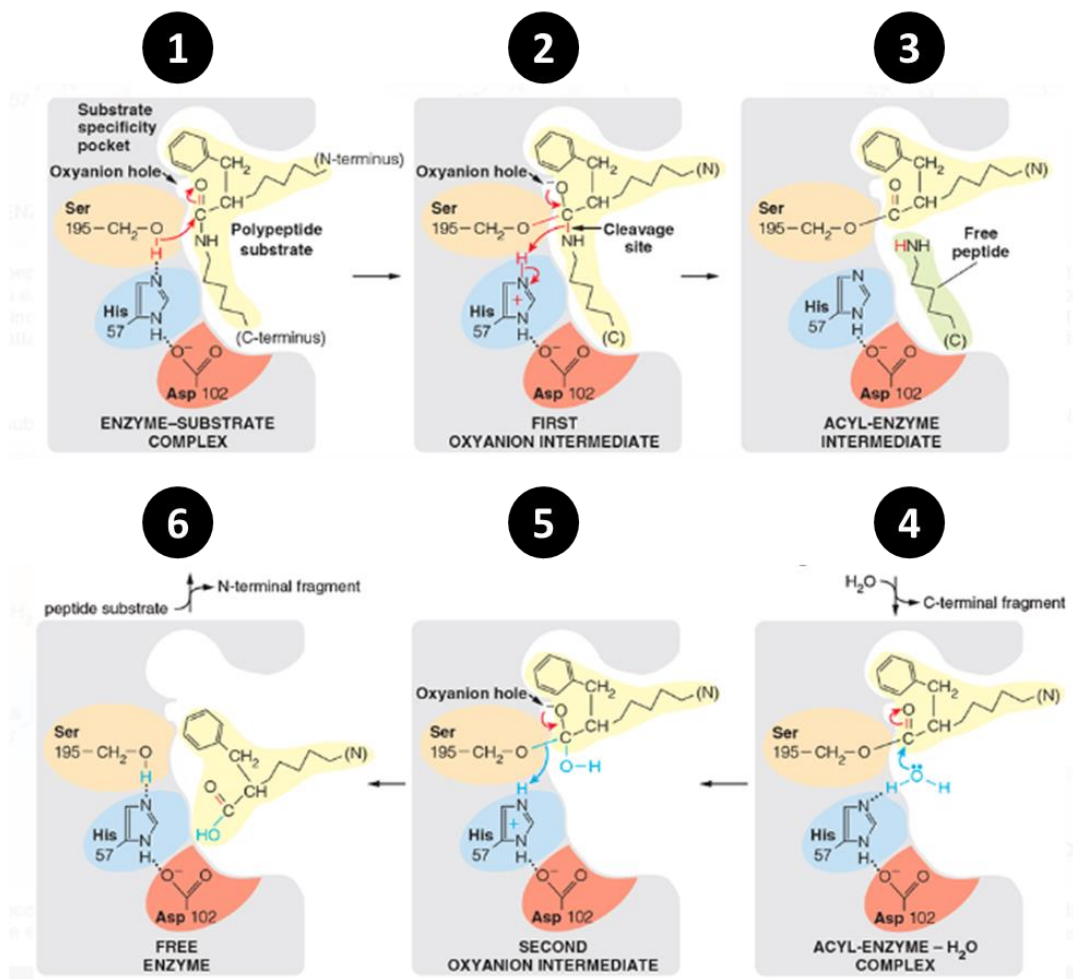


Figure 20: mécanisme de catalyse covalente utilisé par la chymotrypsine.

La triade catalytique de la chymotrypsine est formée par sa sérine en position 195 (Ser, nucléophile), son histidine 57 (His, base) et l'acide aspartique 102 (Asp, acide). La large poche catalytique de la chymotrypsine accueille les groupes cycliques des acides aminés aromatiques.

(1) Lorsque le substrat a pénétré dans la poche catalytique de l'enzyme, la liaison peptidique de l'acide aminé aromatique s'aligne avec la sérine 195.

(2) L'attaque nucléophile de l'oxygène 195 sur le carbone de la liaison peptidique induit la formation d'une liaison covalente transitoire entre ces deux résidus et une protonation de l'azote de l'histidine 57.

(3) L'intermédiaire transitoire formé par la liaison covalente entre l'enzyme et son substrat est appelée acyl-enzyme. A ce stade, l'extrémité C-terminale du peptide clivé quitte la poche catalytique.

(4) L'hydrolyse de l'acyl-enzyme est réalisée par une molécule d'eau dont l'oxygène attaque le carbonyle du substrat, toujours lié à l'enzyme.

(5) Le déplacement de charges et la protonation de l'histidine 57 aboutit à la libération du peptide néoformé (extrémité N-terminale) représentée en (6). En même temps, la sérine 195 capture un proton permettant à la triade catalytique de retrouver son état initial. Figure adaptée de Mathews, Holde, et Appling 2013 [190].

a) Gros plan sur les protéases à sérine

Les protéases à sérine représentent à elles seules plus d'un tiers de l'ensemble des protéases connues [191]. Elles fonctionnent de manière optimale à pH neutre. Les protéases de type trypsine, chymotrypsine et élastase représentent les sous-familles les plus connues des protéases à sérine. Ces sous-familles regroupent différentes protéases présentant parfois peu d'homologie de séquence, mais comportant une affinité identique en termes de substrats. Malgré un mécanisme catalytique commun, les protéases de types trypsine, chymotrypsine et élastase ont pourtant des affinités différentes pour les acides aminés. Ces dissemblances tiennent essentiellement à la taille de leur poche catalytique et à la nature des résidus qui la composent (Figure 21) [191]. Ainsi, les trypsines comportent une poche catalytique étroite, profonde et de charge nette négative qui prend en charge des acides aminés chargés positivement comme l'arginine ou la lysine. Les poches des protéases « chymotrypsine-like » sont quant à elles plus larges et hydrophobes, leur permettant d'accueillir les groupements aromatiques des acides aminés tels que le tryptophane, la phénylalanine ou la tyrosine. Finalement, les élastases possèdent une poche de faible profondeur permettant d'accueillir des résidus courts et non chargés comme l'alanine ou la glycine.

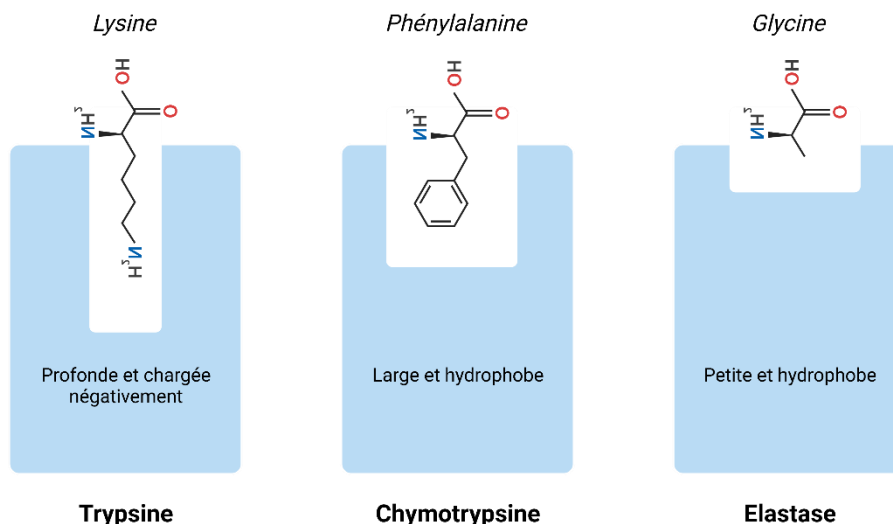


Figure 21: représentation schématique des poches catalytiques des protéases à sérine de types trypsine, chymotrypsine et élastase.

Figure créée avec Biorender.com.

b) Les protéases à cystéine

Les protéases à cystéine (ou thiol protéase) ont un mécanisme d'action similaire aux protéases à sérine, dépendant de la triade catalytique formée par les résidus asparagine, histidine et cystéine. En revanche, les protéases à cystéine fonctionnent à pH acide. Chez les organismes eucaryotes, bon nombre de ces protéases jouent des rôles intracellulaires essentiels [192]. Les cathepsines de type B, H, L, S et K sont des protéases lysosomales qui dégradent des protéines intracellulaires ainsi que certaines protéines exogènes absorbées lors de la digestion alimentaire. Autre exemple, les calpaïnes sont retrouvées de manière ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules, elles sont capables d'activer de nombreuses protéines intracellulaires par protéolyse. Les caspases font également partie de la classe des protéases à cystéine, et jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'apoptose cellulaire [193].

2.1.2. La catalyse par des ions métalliques : cas des métalloprotéases

Les métalloprotéases représentent la plus large classe de protéases chez l'Homme avec plus de 190 membres [194]. Chez ces protéases, l'attaque nucléophile de la liaison peptidique cible est directement assurée par une molécule d'eau activée par un ion divalent Zn^{2+} . Cet ion Zinc est localisé au sein du site actif grâce à des liaisons de coordination qu'il établit avec les acides aminés de l'enzyme.

Les métalloprotéases matricielles (MMP pour *matrix metalloproteinase*) sont parmi les plus étudiées de cette famille. Comme leur nom l'indique, les MMP ont la particularité de pouvoir dégrader les protéines de la matrice extracellulaire, leur conférant un rôle important dans les processus de remodelage tissulaire. Elles sont produites par un large éventail cellulaire allant des cellules épithéliales, aux cellules immunitaires (macrophages, leucocytes, neutrophiles) jusqu'aux myofibroblastes [195]. De par ses propriétés matricielles, cette famille a été intensivement étudiée pour ses implications dans les mécanismes de progression tumorale [196]. Cependant, la diversité des molécules clivées par les MMP, comprenant également des cytokines, des facteurs de croissance ou encore des récepteurs a mis en lumière leur implication dans bien d'autres processus biologiques tels que l'angiogenèse, l'immunité et la réponse inflammatoire [195].

2.1.3. La catalyse acide-base : les protéases à aspartate

Les protéases à aspartate représentent une famille plus modeste comptant une vingtaine de membres chez l'Homme [194]. Tout comme les métalloprotéases, leur réaction d'hydrolyse est directement réalisée par l'activation d'une molécule d'eau mais qui est liée à deux résidus aspartate formant leur site actif. Ces enzymes sont généralement actives à pH acide. La pepsine, produite par la muqueuse gastrique est un membre de cette famille.

2.2. Mécanismes de régulation des protéases

De par leur omniprésence et le caractère irréversible des processus qu'elles médient par clivage, les protéases sont finement régulées au sein de l'organisme. En plus des processus de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle classiques, des mécanismes additionnels permettant de contrôler l'activité des protéases existent.

Premièrement, la plupart d'entre elles sont initialement produites sous forme de précurseurs inactifs nommés zymogènes, contenant un propeptide N-terminal qui bloque l'accès au site catalytique de l'enzyme. Pour être activés, les zymogènes nécessitent le retrait du propeptide par clivage protéolytique, ce qui constitue un premier niveau de contrôle de l'activation des protéases.

Deuxièmement, l'activité des protéases est aussi contrôlée par une multitude d'inhibiteurs produits de manière endogènes par l'organisme. Basée sur leur homologie de séquence, la base de données en ligne sur les protéases et leur inhibiteurs « MEROPS » dénombre plus de 67 familles d'inhibiteurs de protéases [197]. Chaque famille d'inhibiteurs cible en principe une classe spécifique de protéases. Ce manuscrit s'intéressant à une protéase à sérine, la chymotrypsine, les principales familles d'inhibiteurs de cette classe de protéases seront illustrées dans cette section.

a) Les serpines

Les serpines (Serine Protease Inhibitors) constituent la plus large superfamille d'inhibiteurs de protéases avec plus de 3000 membres identifiés à travers le règne vivant [198]. Elles sont présentes de manière quasi-ubiquitaire chez les animaux et sont même retrouvées chez les végétaux, les bactéries et les virus. Les serpines inhibent les protéases par un mécanisme compétitif irréversible qualifié de « piège à souris » [199]. Leur structure tridimensionnelle laisse en effet apparaître une boucle exposée aux protéases environnantes. Le clivage de cette boucle par une protéase induit un changement conformationnel de l'inhibiteur qui vient obstruer définitivement le site catalytique de l'enzyme en se liant de manière covalente avec celle-ci.

Les serpines eucaryotes sont divisées en 16 clades dont le plus abondant est le clade A qui contient exclusivement des inhibiteurs extracellulaires, suivi par le clade B dont les membres sont intracellulaires [200]. Le Tableau 1 récapitule les principales caractéristiques des serpines humaines du groupe A et B. Les serpines A1 (aussi appelée alpha-1-antitrypsine) et A3 (alpha-1-antichymotrypsine) sont les serpines les plus exprimées du clade A. Ce sont des inhibiteurs de protéases à activité trypsique et chymotrypsique. Ces inhibiteurs sont majoritairement synthétisés par le foie et retrouvés en abondance dans l'organisme [201]. Certaines études rapportent que les serpines A1 et A3 peuvent aussi être produites localement dans l'intestin par les cellules immunitaires et épithéliales [202], [203].

De plus, le microbiote intestinal est une source importante de serpines qui contrôle l'activité protéolytique luminale [198]. Les bactéries commensales *Eubacterium siraeum* et *Eubacterium saburreum* produisent par exemple respectivement des serpines nommées : sabuopine et siropine. La sabuopine a une activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase pancréatique [204]. Mkaouar et collègues ont montré que les siropine 1 et 2 produites par *E. saburreum* inhibent respectivement l'élastase et la protéinase-3 du neutrophile [198]. De par la forte activation des neutrophiles observée lors des MICI, cette espèce bactérienne pourrait donc présenter un potentiel bénéfique intéressant.

Tableau 1: description des principales serpines humaines et fonctions associées.Issu de Law *et al.* 2006 [205].

Serpin	Alternative name(s)	Protease target or function
SERPINA1	Antitrypsin	Extracellular; inhibition of neutrophil elastase
SERPINA2	Antitrypsin-related protein	Not characterized, probable pseudogene
SERPINA3	Antichymotrypsin	Extracellular; inhibition of cathepsin G
SERPINA4	Kallistatin (PI4)	Extracellular, inhibition of kallikrein [68]
SERPINA5	Protein C inhibitor (PAI-3)	Extracellular; inhibition of active protein C (see [69] for a review)
SERPINA6	Corticosteroid-binding globulin	Extracellular; non-inhibitory; cortisol binding
SERPINA7	Thyroxine-binding globulin	Extracellular; non-inhibitory, thyroxine binding
SERPINA8	Angiotensinogen	Extracellular; non-inhibitory; amino-terminal cleavage by the protease renin results in release of the decapeptide angiotensin I
SERPINA9	Centerin	Extracellular; maintenance of naive B cells [70]
SERPINA10	Protein Z-dependent proteinase inhibitor	Extracellular; inhibition of activated factor Z and XI
SERPINA11	XP_170754.3	Not characterized
SERPINA12	Vaspin	Extracellular; insulin-sensitizing adipocytokine [71]
SERPINA13	XM_370772	Not characterized
SERPINB1	Monocyte neutrophil elastase inhibitor	Intracellular; inhibition of neutrophil elastase [72]
SERPINB2	Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI2)	Intracellular; inhibition of uPA (see [73] for a review)
SERPINB3	Squamous cell carcinoma antigen-1	Intracellular; cross-class inhibition of cathepsins L and V [6]
SERPINB4	Squamous cell carcinoma antigen-2	Intracellular; cross-class inhibition of cathepsin G and chymase [74]
SERPINB5	Maspin	Intracellular; non-inhibitory; inhibition of metastasis through uncharacterized mechanism
SERPINB6	Proteinase inhibitor-6 (PI6)	Intracellular, inhibition of cathepsin G [75]
SERPINB7	Megsin	Intracellular; megakaryocyte maturation [76]
SERPINB8	Cytoplasmic antiproteinase 8 (PI8)	Intracellular; inhibition of furin [77]
SERPINB9	Cytoplasmic antiproteinase 9 (PI9)	Intracellular, inhibition of granzyme B [78]
SERPINB10	Bomapin (PI10)	Intracellular; inhibition of thrombin and trypsin [79]
SERPINB11	Epipin	Intracellular
SERPINB12	Yukopin	Intracellular; inhibition of trypsin [80]
SERPINB13	Headpin (PI13)	Intracellular; inhibition of cathepsins L and K

b) Les chélonianines

Les chélonianines regroupent des inhibiteurs qui ont une certaine homologie avec un inhibiteur protéolytique initialement identifié chez la tortue de mer *Chelonia*. Cette famille regroupe uniquement deux inhibiteurs chez l'Homme : l'élafine et le SLPI (Secretory Leukocyte

Protease Inhibitor). Ce sont de petites protéines (environ 10 kDa chacune) qui inhibent les protéases de manière réversible.

Le SLPI possède une activité inhibitrice envers un spectre relativement large de protéases à activité de type trypsine, chymotrypsine et élastase (élastase du neutrophile, cathépsine G, trypsine, chymotrypsine, tryptase, chymase) [206]. L'élafine, en revanche, a un spectre d'inhibition plus restreint et inhibe principalement les activités élastolytiques comme les élastases pancréatiques (dont une forme est retrouvée exprimée par l'épithélium intestinal, l'élastase-2), mais aussi l'élastase du neutrophile et la protéinase-3 [207], [208].

Ces inhibiteurs sont exprimés de manière constitutive par de nombreux épithéliums, dont les cellules de l'intestin et par des cellules immunitaires telles que les macrophages ou les neutrophiles [209], [210]. Ils sont aussi considérés comme des inhibiteurs « d'alarme » car leur expression est augmentée par des facteurs de stress ou de dommages tissulaires [206].

c) Les inhibiteurs de type Kazal

Les inhibiteurs de cette classe ont en commun la présence d'un ou plusieurs motifs Kazal au sein de leur séquence peptidique, responsable de leur capacité d'inhibition. Ce domaine est caractérisé par la présence regroupée de six cystéines reliées par des ponts disulfures qui forment une boucle capable d'interagir avec le site actif des protéases à sérine [211]. Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs réversibles. Le premier membre identifié de cette famille est PSTI (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor), un inhibiteur de la trypsine pancréatique, sécrété au sein des acini pancréatiques afin de contrôler l'activation précoce de cette protéase [212]. Cet inhibiteur est également produit par la muqueuse intestinale [213].

En résumé, les protéases représentent donc une large classe d'enzymes omniprésentes dans les tissus et dont l'activité nécessite une régulation stricte à différents niveaux. Les protéases participent à la régulation des fonctions tissulaires via des mécanismes très divers : régulant la maturation de nombreuses protéines, modelant les interactions protéines-protéines, mais aussi en permettant la transmission de signaux cellulaires [189].

2.3. Les Récepteurs Activés par les Protéases (PARs) : les protéases comme molécules de signalisation cellulaire

Le concept que des protéases puissent transmettre des signaux cellulaires est apparu très tôt dans la littérature. Dans les années 1970 déjà, Burger *et al.* observaient que des traitements de fibroblastes en culture avec des enzymes protéolytiques conduisait à une augmentation de la division cellulaire [214]. Depuis, les preuves de la capacité des protéases à agir comme de véritables molécules de signalisation se sont accumulées. Cette fonction de signalisation est permise par leur capacité à cliver de nombreux acteurs moléculaires protéiques. Ainsi, maturation ou dégradation de peptides bioactifs et hormones, clivage de protéines membranaires et de molécules d'adhésion cellulaire sont autant de mécanismes par lesquels ces enzymes peuvent participer à la communication cellulaire [215]. Toutefois, la découverte de récepteurs cellulaires spécifiquement dédiés à ces enzymes, les Récepteurs Activés par les Protéases (PARs, pour Protease-Activated Receptors), a révolutionné ce champ d'étude et introduit le concept de signalisation protéolytique.

2.3.1. Découverte des PARs

L'histoire menant à la découverte des PARs débute avec celle de la recherche des médiateurs de la coagulation sanguine, ayant occupé les scientifiques des décennies durant. Dans les années 1950, des travaux précurseurs identifièrent que la thrombine, une protéase à sérine, pouvait activer les cellules plaquettaires, responsables des phénomènes de coagulation sanguine [216], [217]. Cette protéase, activée lors de lésions tissulaires, était déjà connue depuis longtemps comme étant capable de convertir le fibrinogène en fibrine. Plus tard, en 1979, Glen et Cunningham identifièrent que la thrombine clivait une molécule d'environ 43 kDa à la surface de différentes lignées cellulaires chez qui elle augmentait la prolifération [218]. La piste de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) par cette protéase a plus tard été avancée en observant que cet effet mitogène était associé à l'induction d'une signalisation intracellulaire via l'adénylate cyclase dans des lignées de fibroblastes de Hamster [219].

En 1991, deux publications rapportèrent de manière concomitante l'identification du récepteur responsable de la signalisation de la thrombine [220], [221]. Une fois l'ARN messenger de ce récepteur injecté dans des modèles cellulaires d'expression hétérologue, sa stimulation par la thrombine activait une signalisation calcique intracellulaire. L'équipe de Shaun R. Coughlin a révélé que ce récepteur était unique en son genre : il comportait une longue extrémité extracellulaire contenant un site de clivage par la thrombine et c'est ce clivage qui était responsable de sa signalisation. Initialement appelé récepteur à la thrombine, il fut par la suite renommé « Protease-Activated Receptor 1 » : PAR1.

Au cours des années 1990, trois autres récepteurs aux mécanismes d'activation semblables ont été successivement décrits, complétant ainsi la famille des Récepteurs Activés par les Protéases (Figure 22). En 1994, PAR2 fut cloné [222]. Ce récepteur ne semblait pas répondre à la thrombine mais était activé par des doses très faibles de trypsine. L'observation que les plaquettes des souris déficientes pour PAR1 continuaient à répondre à la thrombine a ensuite mené à l'hypothèse de l'existence d'autres récepteurs à cette enzyme [223]. Ces récepteurs, PAR3 et PAR4, furent successivement identifiés en 1997 et 1998 [224], [225].

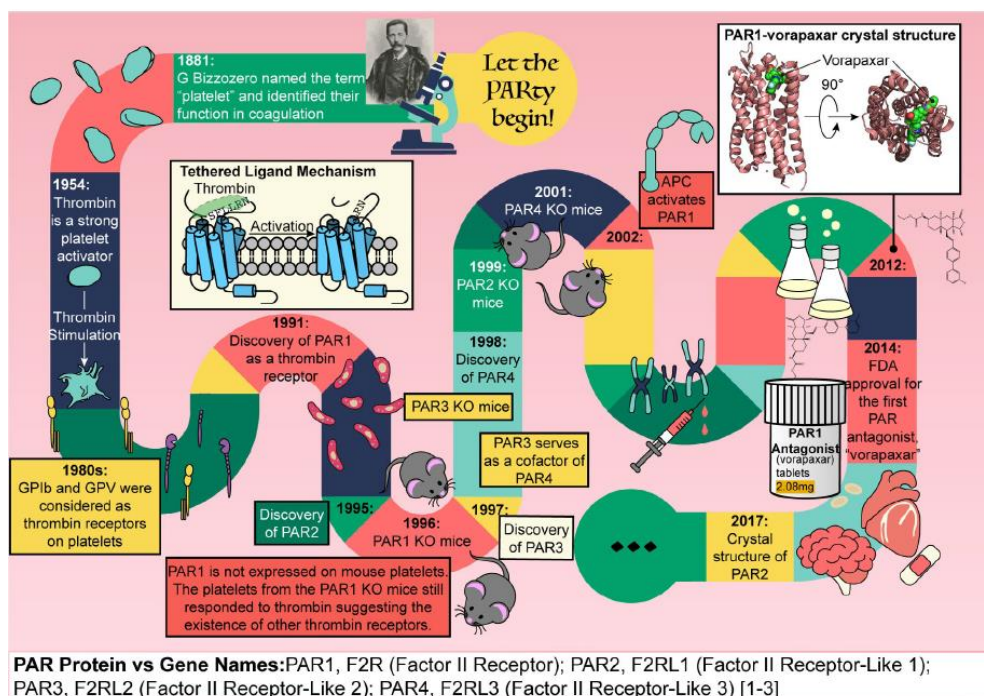


Figure 22: représentation schématique de l'histoire de la découverte des PARs.

Figure issue de Han, Nieman, et Kerlin 2020 [226].

2.3.2. Structure génétique et protéique

Malgré une faible homologie de séquence, les gènes des récepteurs PARs sont tous composés de deux exons séparés par un intron de taille variable. Le premier exon encode un peptide signal et le second contient la séquence du récepteur mature [227]. De manière intéressante les gènes *F2R*, *F2RL1* et *F2RL2* (codant respectivement PAR1, PAR2 et PAR3) sont regroupés au sein du chromosome 5q13 chez l'Homme, alors que la séquence *F2RL3* (codant PAR4) est située sur un chromosome distinct, 19p12 [227].

Les PARs appartiennent à la classe A des RCPG : les « Rhodopsin-like ». La Figure 23 récapitule les principales caractéristiques structurales des différents PARs. D'un point de vue protéique, ils se composent de 7 domaines transmembranaires (TM), reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires (ECL1-3) et intracellulaires (ICL1-3). Leur région N-terminale est extracellulaire. Elle se compose d'un peptide signal, qui est éliminé lors de l'adressage du récepteur à la membrane, suivi d'un propeptide. Lors de l'activation du récepteur, ce propeptide est clivé au niveau d'un site de clivage canonique, libérant ainsi une forme « mature » du domaine N-terminal du récepteur. La protéase historiquement liée à la découverte de chaque PAR est considérée comme son activateur canonique. **Ainsi, La protéase canonique activatrice de PAR1, PAR3 et PAR4 est la thrombine, alors que PAR2 est préférentiellement activé par la trypsine (Tableau 2).**

En outre, PAR1 et PAR3 ont une particularité structurelle les différenciant de PAR4, l'autre récepteur à la thrombine. Au voisinage de leur site de clivage canonique, les domaines N-terminaux de PAR1 et PAR3 comportent en effet un site « hirudin-like » semblable à la structure de l'hirudine, un inhibiteur de thrombine. Cette région hirudin-like présente une très forte affinité pour la thrombine, au niveau d'un site adjacent au site catalytique de l'enzyme (nommé exosite). De ce fait, la présence de ce site hirudin-like sur PAR1 et PAR3 augmente considérablement l'affinité de l'enzyme pour ces deux récepteurs [225], [228]. PAR4 ne possède par ce domaine « Hirudin-like ». Il est donc considéré comme un récepteur de moindre affinité pour la thrombine car il répond à de plus fortes concentrations de thrombine que PAR1 [229].

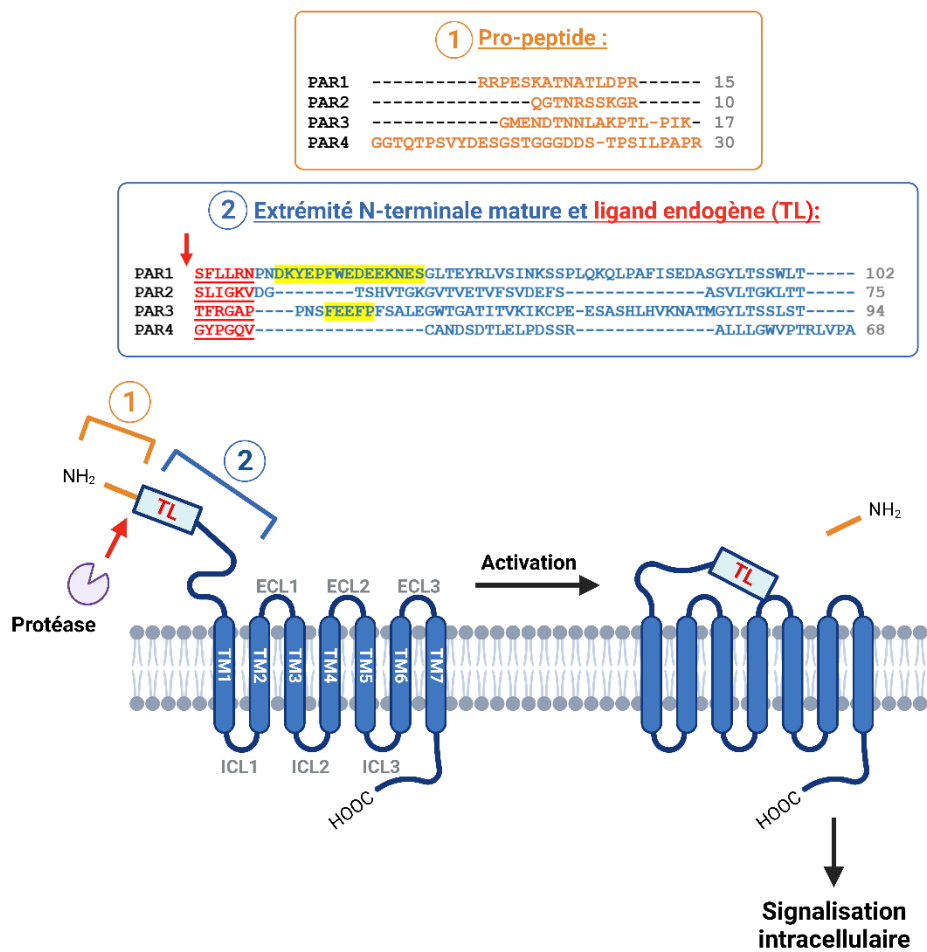


Figure 23: structure protéique des Récepteurs Activés par les Protéases (PARs) humains et mécanisme d'activation canonique.

Le clivage protéolytique des PARs au niveau de leur site canonique d'activation (flèche rouge) libère un ligand endogène (TL : Tethered Ligand), composé d'une courte séquence de 6 acides aminés (séquences en rouge) qui peut alors interagir avec l'ECL2 induisant l'activation du récepteur. Les alignements de séquence des extrémités N-terminales des quatre PARs sont représentés. Après clivage, le propeptide est libéré (séquences orange). Les séquences surlignées en jaune dans le domaine N-terminal mature de PAR1 et PAR3 correspondent au domaine 'hirudin-like'. Figure adaptée de Adams *et al.* 2011 [230] avec Biorender.com.

Tableau 2: sites de clivage canoniques des PARs et ligands activateurs endogènes

	Protéase canonique	Site de clivage canonique	Ligand endogène	Référence
PAR1	Thrombine	LDPR ⁴¹ / S ⁴² FLLRN	S ⁴² FLLRN	[221]
PAR3		LPIK ³⁸ / T ³⁹ FRGAP	T ³⁸ FRGAP	[224]
PAR4		APR ⁴⁷ / G ⁴⁸ YPGQV	G ⁴⁸ YPGQV	[225]
PAR2	Trypsine	SKGR ³⁴ / S ³⁵ LIGKV	S ³⁵ LIGKV	[222]

2.3.3. Mécanismes d'activation des récepteurs PARs

a) Mécanisme d'activation canonique des PARs

Les PARs se démarquent du schéma d'activation classique des RCPG selon lequel un ligand exogène soluble active le récepteur en s'y fixant. Le ligand des PARs est une courte séquence d'acides aminés (6 résidus) contenue au sein même de leur domaine N-terminal extracellulaire. Lorsque le récepteur est intact, ce ligand endogène est lié au propeptide et est donc captif au sein de la séquence du domaine N-terminal du PAR [231]. Cependant, le clivage d'un PAR au niveau de son site canonique par une protéase élimine la partie pro-peptidique de son domaine extracellulaire (Figure 23). L'extrémité N-terminale nouvellement créée va alors servir de ligand endogène (ou tethered ligand, TL) en interagissant avec la seconde boucle extracellulaire du PAR. Cette interaction entraîne un changement de conformation des domaines transmembranaires et l'activation de voies de signalisations intracellulaires, telles qu'une signalisation calcique ou l'activation de kinases intracellulaires. Les voies de signalisation activées en aval des PARs seront décrites en détail dans le sous-chapitre suivant (2.3.4).

La séquence en acides aminés du domaine N-terminal de chaque PAR est unique (Figure 23). En conséquence, l'affinité des différentes protéases pour ces récepteurs est variable et la séquence du ligand endogène est propre à chaque PAR (Tableau 2). Cependant, il est important de noter que le clivage des PARs n'est pas restreint à une seule et même protéase. Au contraire, ils peuvent être clivés par une grande variété d'enzymes protéolytiques, ayant des effets différents sur leur activation (Tableau 3).

Tableau 3: principales protéases clivant les PARs, site de clivage et signalisation associée.

Issu de Chandrabalan et Ramachandran 2021 [232].

	Proteinase	Cleavage site	TL peptide	Signaling pathway	Physiological response
PAR1	Thrombin	R ⁴¹ //SFLLRN	SFLLRN-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ G $\alpha_{12/13}$ G α_{10} β -arrestins	Platelet activation and aggregation, endothelial barrier disruption
	FXa	R ⁴¹ //SFLLRN	SFLLRN-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ G $\alpha_{12/13}$ /Rho β -arrestin/ERK1/2	Proinflammatory, endothelial barrier protection, cell migration inhibition, fibroblast proliferation
	aPC	R ⁴⁶ //NPNDKY	NPNDKYEPF-NH ₂	β -arrestin-2/ERK Akt	Cytoprotective, endothelial barrier protection
	MMP-1	D ³⁹ //PRSFLL	PRSFLLRN-NH ₂	G $\alpha_{12/13}$ /Rho/GTPase MAPK	Platelet thrombogenesis and clot retraction, vascular angiogenesis, disruption of barrier function, ECM remodeling
	MMP-13	S ⁴² //FLLRNP	n.d.	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ ERK1/2 p38 MAPK	Cardiac dysfunction
	Elastase	L ⁴⁵ //RNPNDK	RNPNDKYEPF-NH ₂	G α_i /MAPK	Stress fiber formation, endothelial barrier permeability
	Proteinase-3	A ³⁶ //TLDPRS	TLDPRS-NH ₂	G α_i /MAPK	Stress fiber formation, endothelial barrier permeability
	Granzyme-K	n.d.	n.d.	ERK1/2 p38 MAPK	Cytokine secretion, fibroblast proliferation
PAR2	Trypsin	R ³⁶ //SLIGKV	SLIGKV-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ G $\alpha_{12/13}$ /Rho G α_i /cAMP β -arrestin-1/2 ERK1/2	Proinflammatory, mechanical and thermal hyperalgesia, hypotension, cardioprotective
	Tryptase	R ³⁶ //SLIGKV	SLIGKV-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ G $\alpha_{12/13}$ /Rho G α_i G α_i /cAMP MAPK β -arrestin Akt ERK1/2	Proinflammatory, hyperalgesia, mast cell degranulation, cell proliferation, paracellular intestinal permeability
	Elastase	S ⁶⁷ //VLTGKL	Not active	Rho/ERK1/2	Inflammation, pain
	Cathepsin-S	E ⁵⁶ //TVFSVD	TVFSVDEFSA-NH ₂	G α_i /cAMP	Proinflammatory, visceral hyperalgesia, itch
	KLK-14	R ³⁶ //SLIGKV	SLIGKV-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ ERK1/2	Proinflammatory, tumorigenesis
PAR3	Thrombin	K ³⁸ //TFRGAP	TFRGAP-NH ₂ (activate PAR1 and PAR2)	ERK1/2	IL-8 production
	aPC FXa	R ⁴¹ //GAPPNS R ⁴¹ //GAPPNS	GAPPNSFEEFPFS GAPPNSFEEFPFS	n.d. n.d.	Cytoprotective n.d.
PAR4	Thrombin	R ⁴⁷ //GYPGQV	GYPGQV-NH ₂	G $\alpha_{q/11}$ /Ca ²⁺ G $\alpha_{12/13}$ β -arrestins	Platelet activation and aggregation
	Trypsin	R ⁴⁷ //GYPGQV	GYPGQV-NH ₂	Ca ²⁺	Neutrophil recruitment

b) Activation biaisée des PARs

En fonction de l'affinité des protéases pour le domaine extracellulaire des PARs, le clivage de ces récepteurs peut intervenir au niveau de leur site canonique ou à des sites distincts, générant des ligands de séquences différentes dont les propriétés de signalisation peuvent varier (Figure 24). Pour illustrer ce phénomène : la protéinase-3, une protéase à sérine des neutrophiles, clive PAR1 entre les résidus A³⁶/T³⁷ révélant ainsi le peptide T³⁷LDPRSFLLR à l'extrémité N-terminale du récepteur [233]. Ce clivage active la voie de signalisation des kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK1/2) mais est incapable d'induire une signalisation calcique, contrairement à la thrombine qui active les deux. De même, l'élastase du neutrophile clive PAR2 au niveau des résidus S⁶⁸/V⁶⁹, situés bien en aval du site canonique [234]. Contrairement à la trypsine, ce clivage active la phosphorylation de ERK1/2 sans activer de signalisation calcique intracellulaire dans une lignée cellulaire rénale exprimant PAR2 (KNRK). **Ainsi, l'induction d'une signalisation en aval d'un récepteur PAR clivé à un endroit différent du site canonique (et parfois même en aval de celui-ci) est appelée « activation biaisée ».** Il est à noter qu'aucun cas d'activation biaisée de PAR3 et PAR4 n'a été rapporté jusqu'à aujourd'hui.

c) Désarmage des PARs

Alors que certaines protéases activent les PARs ou permettent une activation biaisée, d'autres protéases ont la capacité de cliver ces récepteurs sans entraîner de signalisation intracellulaire. **Un désarmage repose sur un clivage au sein du ligand endogène canonique ou en aval, rendant le récepteur inapte à une activation ultérieure par une protéase canonique** (Figure 24). La protéase anti-coagulante plasmine désarme PAR1 vis-à-vis de la thrombine en clivant au niveau de trois sites différents situés en aval du ligand canonique : R⁷⁰/L⁷¹, K⁷⁶/S⁷⁷ et K⁸²/Q⁸³ [235]. L'élastase, la protéinase-3 ou encore la cathepsine G peuvent aussi désarmer PAR1 [236]. Pour PAR2, La cathepsine G et la protéinase-3 ont toutes les deux été décrites comme pouvant désarmer le récepteur vis-à-vis de la trypsine [234].

L'ensemble des mécanismes par lesquels les protéases interagissent avec les PARs (activation canonique, biaisée, désarmage), montrent donc que la seule identification de la capacité d'une protéase à cliver un PAR n'est pas suffisante pour prédire ses effets biologiques. Il est nécessaire de caractériser son site de clivage et la signalisation associée.

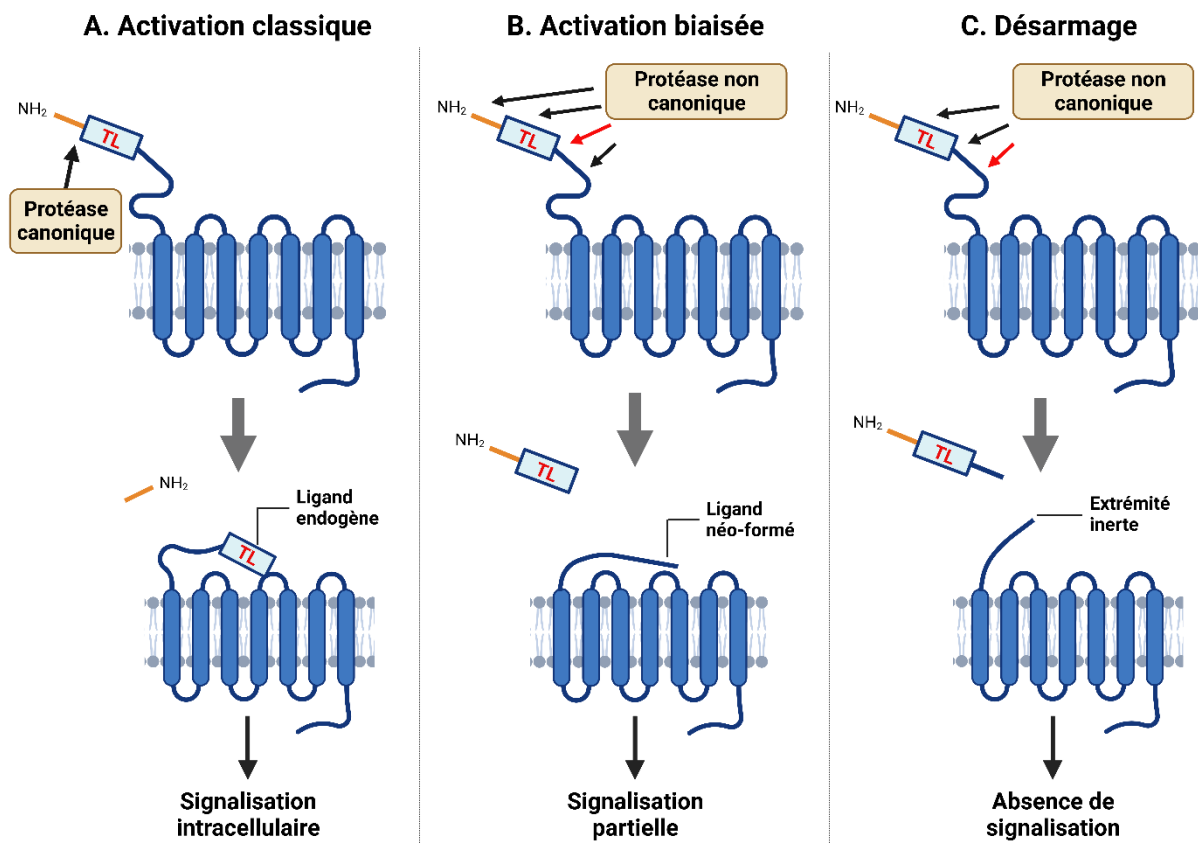


Figure 24: mécanismes d'activation et de désarmage des PARs par les protéases.

(A) Les PARs peuvent être activés par clivage de leur domaine N-terminal au niveau de leur site canonique, libérant ainsi le ligand endogène (TL : Tethered Ligand), qui peut alors interagir avec l'ECL2 du récepteur et déclencher l'activation de voies de signalisation intracellulaire. (B) D'autres protéases peuvent cliver les PARs au niveau de sites non canoniques, révélant une nouvelle extrémité N-terminale différente du ligand endogène canonique, mais pouvant aussi activer des signaux cellulaires : on parle d'activation biaisée. L'activation des voies de signalisation intracellulaire est souvent partielle dans ce cas de figure. (C) Enfin, le clivage d'un PAR au sein de la séquence du ligand endogène, ou en aval peut désarmer le récepteur, n'induisant aucune signalisation et le rendant inapte à une activation ultérieure par une autre protéase. Figure créée avec Biorender.com.

d) Activation par des agonistes synthétiques

L'étude de la signalisation des PARs est relativement complexe de par la capacité de certaines protéases à activer plusieurs PARs à la fois. Pour cette raison, le développement d'outils pharmacologiques capables de cibler spécifiquement chaque PAR fait l'objet de recherches actives.

Rapidement après leur découverte, de courts peptides synthétiques mimant la séquence des ligands endogènes des PARs se sont rapidement imposés comme des outils précieux. Ces peptides sont capables d'activer les PARs indépendamment de leur clivage en interagissant directement avec les boucles extracellulaires des récepteurs. Les peptides TFLLR-NH₂ et SLIGKV-NH₂ sont respectivement des activateurs très puissants de PAR1 et PAR2 [237], [238]. Le peptide SLIGRL-NH₂ dérivé de la séquence murine de PAR2 est également souvent utilisé. L'ajout d'un groupement furoyl à ce peptide (2-furoyl-LIGRLO-NH₂) a permis d'augmenter significativement son efficacité et sa durabilité *in vivo* [238], [239]. Pour l'étude de PAR4, la séquence du ligand endogène a été légèrement modifiée pour donner AYPGKF, améliorant près de 10 fois son efficacité *in vitro* [240].

Aucun des peptides dérivés du ligand endogène putatif de PAR3 tel que le composé TFRGAP n'active ce récepteur [224]. Il convient de noter que la capacité de ce récepteur à induire une signalisation de manière autonome est grandement remise en question dans la littérature. Cependant, l'équipe de T.J. Price a récemment apporté la preuve qu'un nouvel agoniste peptidique lié à un groupement lipidique était capable d'activer une signalisation calcique via ce récepteur dans des neurones sensitifs [241].

En outre, pour étudier l'effet des clivages non canoniques des PARs, il est courant de synthétiser des peptides correspondants à l'extrémité N-terminale révélée par une protéase d'intérêt et d'étudier leurs effets pharmacologiques. Trivedi et collègues ont par exemple montré que le peptide de synthèse PRSFLLRN révélé lors du clivage de PAR1 par la protéase MMP-1 récapitulait tout à fait les effets de cette enzyme sur les cellules plaquettaires [242].

2.3.4. Transduction du signal

a) Introduction à la signalisation des RCPG

Les PARs appartiennent à la famille des RCPG. De manière générale, les RCPG répondent aux stimuli extérieurs des cellules en recrutant des effecteurs de signalisation intracellulaire tels que les protéines G hétérotrimériques [243]. Ces protéines G se composent d'un assemblage de trois sous-unités α , β et γ . A l'état inactif, la sous-unité α de ce complexe est liée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP). La liaison d'un ligand sur un GPCR entraîne un changement de conformation du récepteur qui peut alors interagir avec une protéine G hétérotrimérique en favorisant l'échange de la molécule de GDP portée par la sous-unité α , avec une molécule de guanosine triphosphate (GTP). La protéine $G\alpha$ liée au GTP se dissocie du complexe $\beta\gamma$ donnant ainsi deux unités fonctionnelles qui vont activer séparément des voies de signalisation intracellulaires. Les protéines G hétérotrimériques sont différenciées par le type de sous-unité $G\alpha$ qu'elles comportent. Ces dernières sont regroupées en 4 grandes familles qui activent différentes voies de signalisation [244], [245] :

- **Les protéines $G\alpha_{q/11}$** : activent la Phospholipase C (PLC), une enzyme membranaire qui catalyse la conversion d'un phospholipide membranaire en inositol triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 peut alors se fixer à ses récepteurs présents à la surface du réticulum endoplasmique (RE) menant au relargage des stocks de calcium du RE vers le cytoplasme. Le calcium va agir en tant que second messager en activant des protéines sensibles à cet ion. En parallèle, le DAG active la Protéine Kinase C (PKC) qui active de nombreux effecteurs de la réponse cellulaire par phosphorylation.
- **Les protéines $G\alpha_s$** : stimulent l'enzyme adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP en AMP cyclique (AMPc). L'accumulation d'AMPc intracellulaire active notamment la PKA (Protéine Kinase AMPc dépendante), capable d'activer indirectement la transcription de certains gènes cibles de la voie AMPc.
- **Les protéines $G\alpha_{i/o}$** : possèdent la faculté d'inhiber l'adénylate cyclase.
- **Les protéines $G\alpha_{12/13}$** : activent la voie des Rho GTPases capables d'activer de nombreuses kinases régulant les fonctions cellulaires, dont les kinases associées aux protéines Rho (ROCK).

En règle générale, chaque GPCR est capable de se coupler avec différents types de protéines $G\alpha$. Bon nombre des voies de signalisation présentées ici sont interconnectées et aboutissent à l'activation de médiateurs communs tels que les « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK) dont font partie les protéines ERK1/2 qui agissent comme de véritables carrefours de signalisation [246].

b) Voies de signalisation des PARs dépendantes des protéines G

PAR1 et PAR2 sont tous deux capables de se coupler aux protéines **$G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_i$ et $G\alpha_{12/13}$** et d'induire les voies de signalisation associées (Figure 25) [247], [248], [249], [250]. **PAR4** peut quant à lui recruter les protéines **$G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$, mais pas les $G\alpha_i$** [240], [251]. Concernant **PAR3**, l'une des seules études rapportant une signalisation directe de ce récepteur dans des cellules épithéliales pulmonaires A459 indiquait que son activation par la thrombine menait à une signalisation dépendante des **$G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$** [252]. De tels résultats n'ont jamais été rapportés depuis pour ce récepteur. Il convient toutefois de rappeler que l'activation de ces voies de signalisation varie énormément selon la nature de la protéase impliquée dans l'activation du récepteur et le type cellulaire ciblé.

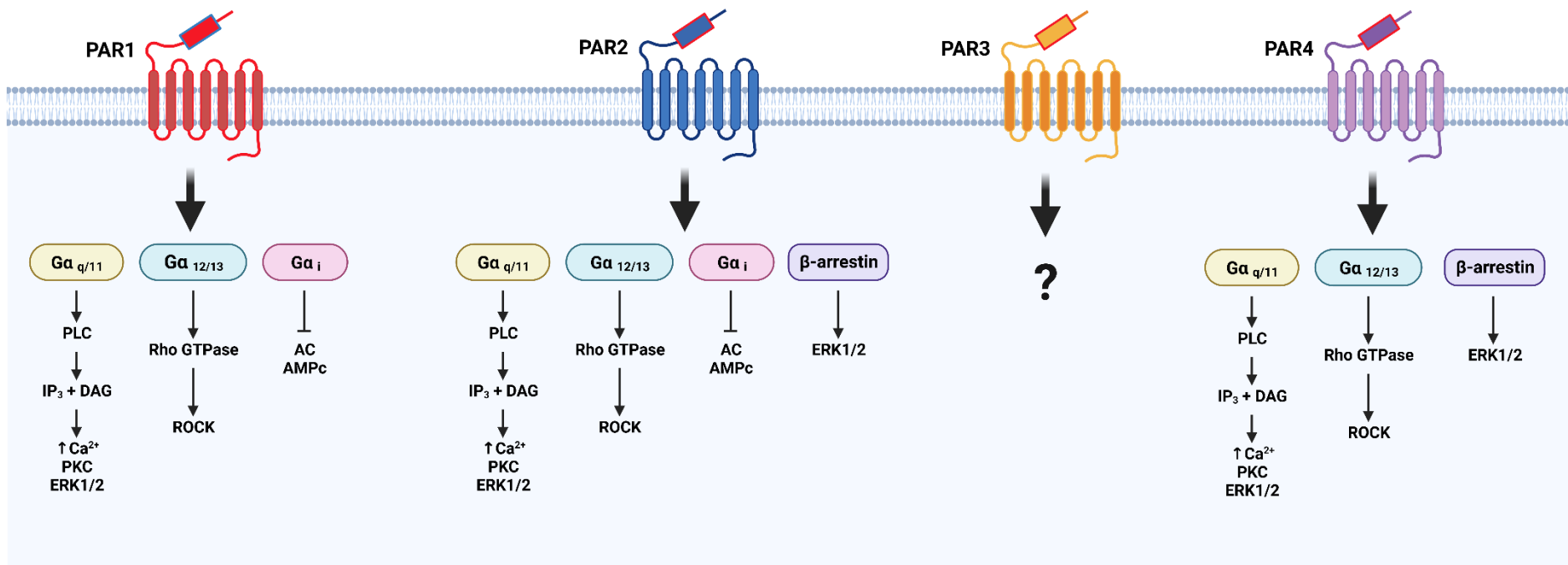


Figure 25: schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par les PARs.

Figure adaptée de Lucena et McDougall 2021 et créée avec Biorender.com.

c) Terminaison du signal

Un concept général veut qu'une fois activés, les RCPG soient rapidement découplés des protéines G et internalisés par endocytose [253] (Figure 26). Ces phénomènes permettent de limiter la durée d'activation de la signalisation d'un GPCR et de contrôler sa présence à la surface cellulaire. Selon ce modèle, après activation par leur ligand, les RCPG sont phosphorylés au niveau de sérines ou de thréonines situées dans les domaines intracellulaires du récepteur par les kinases de la famille GRK (G protein-coupled receptor kinase). Cette phosphorylation permet le recrutement de la β -arrestine qui se fixe à la partie intracellulaire du récepteur, empêchant ainsi son couplage avec les protéines G. La β -arrestine forme également un pont moléculaire avec des complexes protéiques clathrine-AP2 qui recouvrent la face interne de la membrane plasmique permettant son invagination et la formation d'une vésicule d'endocytose autour du récepteur. Au sein des endosomes, les RCPG sont soit dégradés, soit recyclés et redirigés vers la membrane. Etant donné que les PARs sont à « usage unique », un récepteur PAR clivé ne peut pas être recyclé à la membrane. Certains GPCR peuvent aussi être internalisés indépendamment de leur activation par un agoniste.

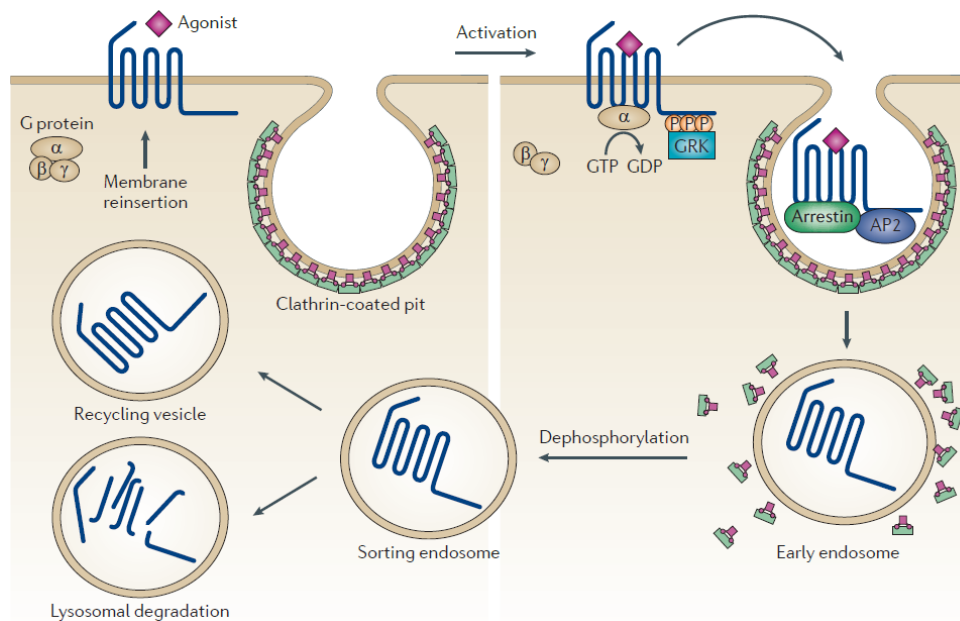


Figure 26: mécanisme général de désensibilisation et d'internalisation des RCPG.

Figure issue de Ramachandran *et al.* 2012 [254].

Des sites de phosphorylation par les GRK sont présents au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire de PAR1, PAR2 et PAR4, cependant leurs mécanismes de désensibilisation et d'internalisation semblent varier [230].

PAR1 possède la particularité d'être constitutivement internalisé puis recyclé sous sa forme non activée, contrôlant ainsi son niveau d'expression à la membrane [255]. Cette internalisation constitutive se fait par endocytose via le complexe clathrine-AP2 mais ne dépend pas de la phosphorylation du récepteur ni du recrutement de la β -arrestine [256]. Le taux d'internalisation de PAR1 semble plutôt contrôlé par la présence de motifs ubiquitine au niveau de son domaine intracellulaire qui empêche la fixation du complexe clathrine-AP2 [257]. Une fois activé, PAR1 est rapidement phosphorylé, désensibilisé via la β -arrestine et internalisé pour être dégradé [258]. Ce n'est cependant pas la β -arrestine qui déclenche cette internalisation, mais plutôt par la perte des motifs ubiquitines à son domaine C-terminal [257]. Ce mécanisme fait de PAR1 un récepteur assez atypique parmi les RCPG.

PAR2 suit une voie plus classique dans laquelle l'activation du récepteur déclenche sa phosphorylation puis sa désensibilisation et internalisation via le recrutement des protéines β -arrestine 1 et 2 [259], [260].

PAR4 est aussi capable d'interagir avec la β -arrestine, cependant elle n'est pas nécessaire à son internalisation qui dépend directement de son interaction avec le complexe clathrine-AP2 [261]. Enfin, les mécanismes de désensibilisation et de trafic de PAR3 n'ont, jusque-là, jamais été étudiés.

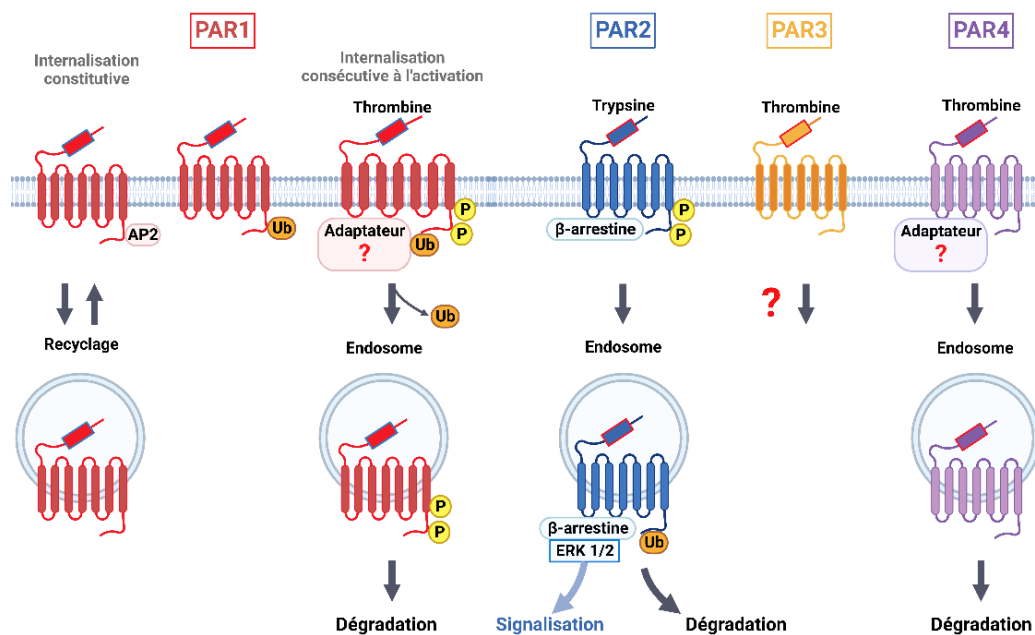


Figure 27: représentation schématique des mécanismes de désensibilisation et d'internalisation des PARs.

Figure adaptée de Arora, Ricks, et Trejo 2007 [262] et créée sur Biorender.com.

d) Signalisation indépendante des protéines G

L'internalisation rapide des PARs, consécutive à leur activation, n'est pas uniquement une manière de mettre fin à leur signalisation. Au contraire, elle peut représenter un moyen d'activer des voies de signalisation intracellulaire de manière soutenue, indépendamment des protéines G (Figure 25).

Il a ainsi été montré que la β -arrestine, qui s'associe à PAR2 au cours de son endocytose peut agir comme un adaptateur capable de recruter les kinases ERK1/2 et médier une activation prolongée de leur signalisation [263]. Ce type de signalisation a notamment été impliqué dans des effets délétères de PAR2 au niveau intestinal, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale et la persistance de l'inflammation dans des modèles de colites expérimentales [264], [265]. Des mécanismes de signalisation endosomale via un couplage à la β -arrestine ont aussi été rapportés pour PAR4 [266], [267].

2.3.5. Interactions des PARs avec d'autres récepteurs

a) Les PARs comme cofacteurs

A la surface des cellules, les RCPG sont souvent regroupés au niveau de microdomaines membranaires [268]. En plus d'une activation individuelle par une protéase, de nombreux travaux ont montré que les PARs pouvaient influencer l'activité de récepteurs adjacents en formant des homodimères ou des hétérodimères.

Les PARs peuvent s'assembler en homodimères (association de deux PARs identiques), ce qui a été notamment rapporté pour PAR1 et PAR2, mais les implications fonctionnelles de ce type d'assemblage restent encore inconnues [269].

En revanche, la capacité des PARs à former des complexes avec des récepteurs de natures différentes « hétérodimères » est bien connue. Ces interactions peuvent mener au phénomène de co-activation ou transactivation qui se produit lorsque l'activation d'un PAR conduit rapidement à l'activation de la signalisation cellulaire d'un deuxième récepteur de surface cellulaire.

Ces phénomènes ont été décrits pour la première fois par l'équipe de Shaun Coughlin en tentant de comprendre l'importance de PAR3 dans les phénomènes d'activation

plaquettaire chez la souris [270]. Les cellules plaquettaires murines expriment à la fois PAR4 et PAR3. Ce dernier était préalablement connu comme étant incapable d'induire une signalisation autonome. Pourtant, Coughlin *et al.* ont observé que sa délétion entraînait une réduction drastique de l'activation plaquettaire en réponse à la thrombine. Les auteurs décrivent ainsi que l'expression hétérologue de PAR4 par des cellules COS-7 permettait l'activation d'une signalisation IP₃ en réponse à la thrombine, ce qui n'était pas retrouvé lors de l'expression unique de PAR3. Cependant, la co-expression de PAR3 et PAR4 potentialisait fortement cette réponse. Des études cristallographiques ont permis d'expliquer ce phénomène [271]. La présence du site « hirudin-like » au niveau du domaine extracellulaire de PAR3 lui permet de se lier avec une très haute affinité à l'exosite de la thrombine. La thrombine clive ainsi PAR3 tout en restant liée à celui-ci via son exosite. Ce clivage entraîne un changement de conformation de PAR3, permettant au site actif de la thrombine d'accéder facilement aux récepteurs PAR4 environnants et de les activer (Figure 28). Ce rôle de cofacteur est d'ailleurs l'une des seules fonctions connues actuellement pour PAR3. Depuis, des mécanismes similaires ont été observés entre PAR1-PAR4 à la surface des plaquettes humaines et PAR1-PAR2 dans un contexte endothélial [272], [273].

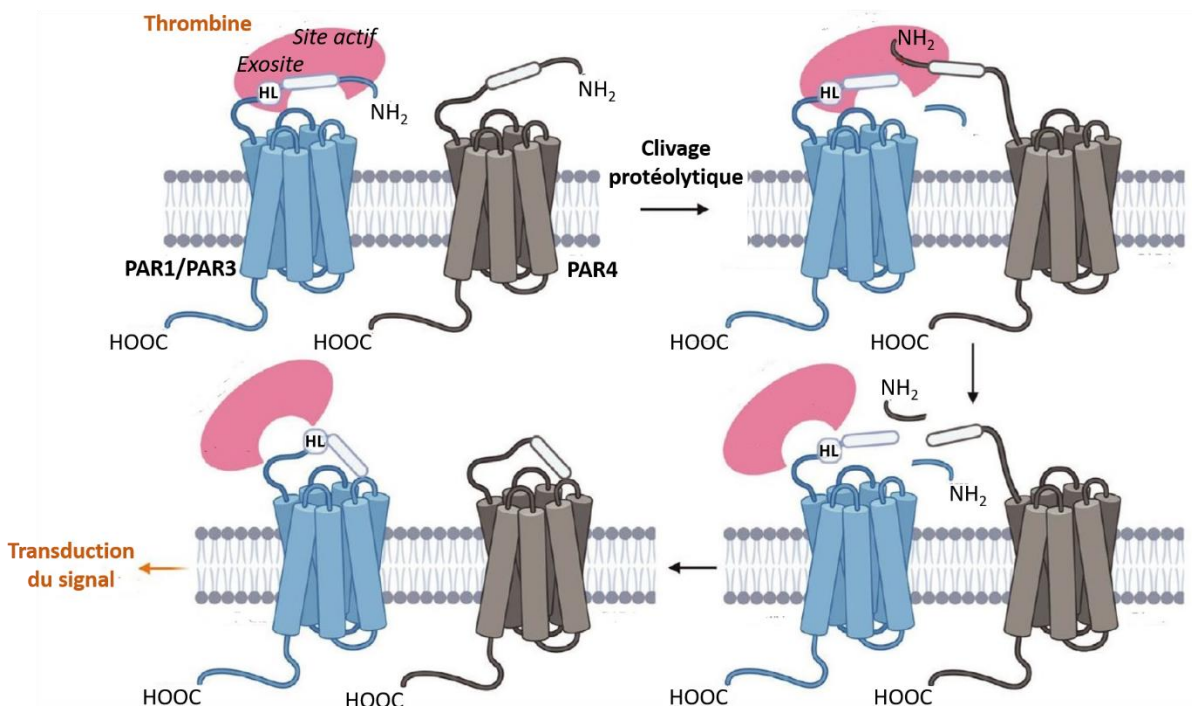


Figure 28: co-activation de PAR3 et PAR4.

Figure adaptée de Chandrabalan et Ramachandran 2021 [232].

b) Transactivation d'autres récepteurs par les PARs

Les PARs ont également la capacité de transactiver des récepteurs de nature totalement différente comme des récepteurs à activité tyrosine kinase par exemple. L'exemple le plus connu est probablement la transactivation du récepteur à l'EGF par PAR1 et PAR2. Le mécanisme sous-jacent implique une libération des ligands de la voie EGF consécutive à l'activation des PARs, menant à l'activation de leur récepteur. Ce processus semble réguler de nombreuses fonctions des cellules épithéliales intestinales, allant de la prolifération à la production de mucus [274], [275]. Les PARs ont aussi été associés à la transactivation d'autres récepteurs parmi lesquels des récepteurs au prostanoïdes ou encore des récepteurs de type « Toll-Like » (TLRs) [269].

2.3.6. Expression intestinale des PARs

Les PARs sont très exprimés au niveau intestinal, avec une distribution cellulaire variable (Figure 29).

Cellules immunitaires : l'expression des PARs a été retrouvée à la surface de nombreuses cellules immunitaires. Les quatre PARs sont exprimés par les monocytes et neutrophiles [276], [277]. PAR1 et PAR2 ont aussi été retrouvés à la surface des mastocytes et impliqués dans leur activation [278].

Cellules musculaires lisses : l'expression de PAR1 et PAR2 a été détectée à la surface des cellules musculaires lisses intestinales dans des modèles murins [279], [280].

Mésenchyme : la présence de PAR2 a récemment été rapportée à la surface des fibroblastes intestinaux humains [281].

Système nerveux entérique et neurones sensitifs : chez l'Homme et la souris, l'expression des quatre PARs a initialement été décrite dans les neurones sensitifs de la racine dorsale qui innervent tous les organes périphériques, dont l'intestin [282], [283], [284], [285]. En dehors des plaquettes, les fibres sensitives sont d'ailleurs un des tissus où PAR3 est le plus exprimé [241], [286]. La présence de PAR1 et PAR2 a aussi été décrite dans les plexus nerveux entériques [265], [279].

Cellules épithéliales intestinales : L'expression de PAR2 par les cellules épithéliales a été retrouvée au niveau messager et protéique tout au long du tractus intestinal et colique [265], [287]. Ce récepteur semble être présent aussi bien au pôle basolatéral des cellules épithéliales qu'à leur face apicale [288], [289], [290]. Darmoul et collègues ont décrit que l'expression de PAR1 par les cellules épithéliales intestinales était restreinte aux tissus cancéreux [291]. Cependant, d'autres études ont aussi rapporté la présence de PAR1 dans l'épithélium intestinal non cancéreux [292], [293]. PAR4 a aussi été identifié à la surface de l'épithélium colique chez la souris et dans des organoïdes intestinaux humains [294], [295].

De par la forte expression des PARs au niveau intestinal (notamment par les cellules épithéliales) et la complexité de leur signalisation, l'identification des protéases régulant l'activation de ces récepteurs est un donc un enjeu majeur.

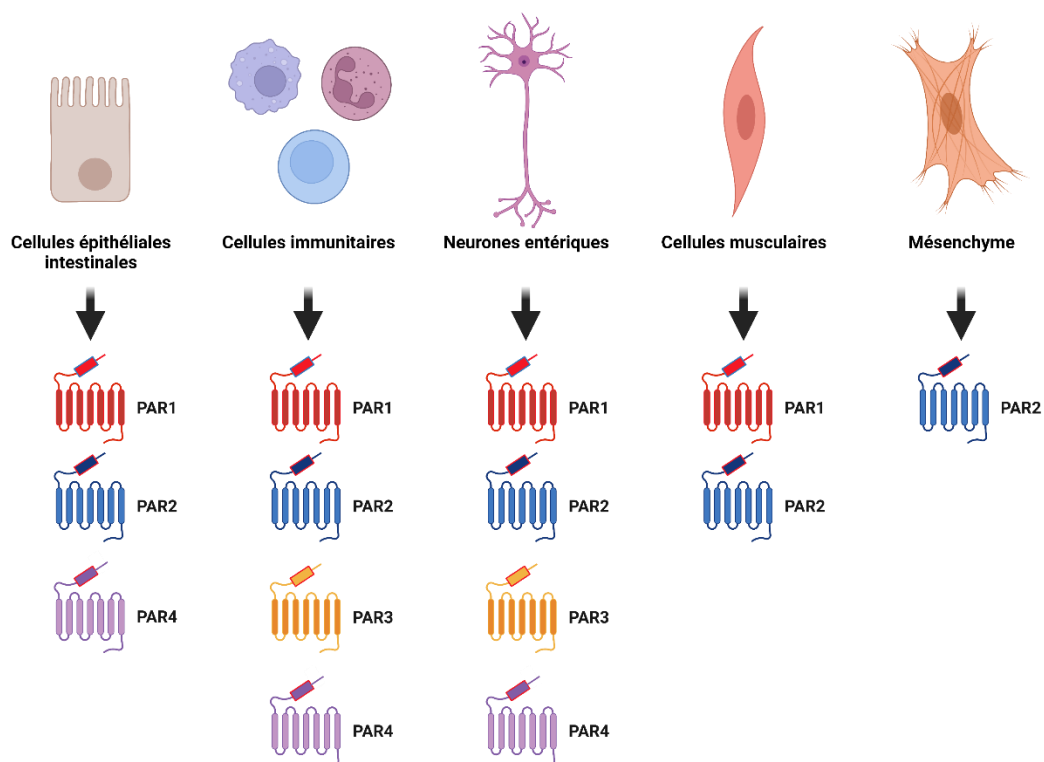


Figure 29: expression des PARs à la surface des cellules intestinales.

Figure créée avec Biorender.com.

2.4. Implication des protéases et de leurs récepteurs dans la physiologie de l'épithélium intestinal

Les protéases sont exprimées par une grande variété de cellules dans l'intestin et en fait donc l'un des organes les plus exposés à ces enzymes.

Le pancréas sécrète d'importantes quantités de protéases digestives qui sont ensuite retrouvées dans la lumière intestinale et participent à la digestion des aliments. Un niveau de preuve croissant indique que le microbiote produit également un large éventail d'enzymes protéolytiques [296]. Au sein du tissu, les cellules immunitaires résidentes comme les macrophages ou les mastocytes sont dotées d'un arsenal protéolytique important parmi lesquelles on retrouve les granzymes, tryptase, chymase, cathepsine G ou autres MMP [175]. L'épithélium, à l'interface entre ces deux milieux, se retrouve donc particulièrement exposé aux signaux protéolytiques. Plus récemment, les cellules épithéliales elles-mêmes ont été découvertes comme une source de protéases importante, exprimant de manière inattendue des protéases comme la thrombine ou certaines formes d'élastase et de trypsine [208], [297], [298], [299].

Cette myriade de protéases, par des mécanismes dépendants ou non des récepteurs PARs, régule des fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie épithéliale qui seront illustrées de manière non exhaustive dans cette section et dans la Figure 30.

2.4.1. Maturation de protéines bioactives

Dans l'intestin, de nombreuses molécules bioactives sont produites sous la forme de précurseurs nécessitant un clivage protéolytique pour acquérir leur conformation active. De nombreuses protéases participant à ces processus de maturation. Par exemple, les cellules de Paneth expriment la métalloprotéase MMP-7 chez la souris, ou des trypsines chez l'homme responsables de la maturation de peptides antimicrobiens sécrétés comme les α -défensines [300]. Enfin, les cellules entéro-endocrines sécrètent un large panel d'hormones peptidiques comme le GLP1 dont la maturation nécessite un clivage de la part de la protéase « Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 » (PCSK1) [301].

2.4.2. Régulation des sécrétions épithéliales et du transport des ions

a) Sécrétion de prostaglandines

Dès 1997, Kong *et al.* décrivent que la stimulation apicale d'explants jéjunaux de souris avec de la trypsine ou un peptide agoniste de PAR2 induisait la sécrétion de prostaglandine du côté basolatéral de la muqueuse [290].

b) Transport des ions

Depuis la découverte de leurs récepteurs, les protéases se sont aussi avérées être des régulatrices du transport des ions de part et d'autre de l'épithélium, qui dictent les mouvements hydriques dans l'intestin. Ainsi, la stimulation basolatérale de PAR1 et PAR2 entraîne la sécrétion d'ions chlorure chez des lignées épithéliales intestinales (SCBN) et coliques (Caco-2) [288], [292], [302]. Des effets similaires ont été observés pour PAR2 sur des tissus coliques humains et murins montés en chambres de Ussing [303].

c) Production de mucus

La formation de la couche de mucus est aussi sous le contrôle étroit des protéases. Dans l'intestin grêle, les cellules épithéliales expriment une métalloprotéase nommée méprine B qui détache rapidement les mucines de la surface des cellules caliciformes après leur sécrétion. Ce clivage permet d'éviter que le mucus adhère de manière prolongée à l'épithélium et réduit ainsi sa colonisation par le microbiote [304]. La stimulation de PAR2 à la surface des cellules caliciformes a aussi été associée à une augmentation de la production de mucines *in vitro* [274], [305]. De manière intéressante, Kawabata et collègues ont montré que des injections intraveineuses de peptides agonistes de PAR2 chez le rat induisaient une sécrétion de mucus uniquement dans l'estomac [306].

2.4.3. Régulation de la perméabilité

De nombreux exemples de régulation de la perméabilité épithéliale par les protéases sont présents dans la littérature et incluent des mécanismes très variés.

Certaines de ces enzymes ont un impact bénéfique sur la barrière comme la matriptase-1. Cette protéase à activité de type trypsine est transmembranaire et présente à la surface des cellules épithéliales intestinales. Elle joue un rôle essentiel dans le maintien des

jonctions serrées et les souris déficientes pour cette protéase présentent une perméabilité paracellulaire dramatiquement augmentée, ainsi qu'une colite [307]. Parmi les mécanismes avancés, la matriptase-1 diminuerait la présence à la membrane de la claudine 2, connue pour former des pores paracellulaires [308]. A l'inverse, d'autres protéases comme la MMP-9 ou la protéase bactérienne fragilysine diminuent fortement la perméabilité épithéliale paracellulaire en déstabilisant les jonctions serrées [309], [310].

Véritables relais du tonus protéolytique environnant, les PARs contrôlent aussi la fonction de barrière de l'épithélium. De manière générale, l'activation de PAR1 et PAR2 à la surface des cellules épithéliales semble augmenter la perméabilité intestinale mais par des mécanismes différents. L'administration intracolique d'agonistes de PAR2 chez la souris a très tôt été associée à une augmentation de la perméabilité paracellulaire [289], [311]. De tels effets ont aussi été observés *in vitro*, lors de la stimulation basolatérale de ce récepteur [312]. La signalisation de PAR2 mènerait à l'activation de la protéine MLCK (Myosin Light Chain Kinase). Cette kinase phosphoryle les chaînes de myosines qui ont alors la capacité d'exercer une force de traction sur les filaments d'actine des cellules épithéliales. La contraction des filaments d'actine qui sont reliés aux jonctions serrées entraînent finalement leur ouverture et l'augmentation de perméabilité observée [313]. Chin *et al.* ont décrit que l'administration intra-colique d'agonistes de PAR1 augmentait également la perméabilité intestinale paracellulaire chez la souris en diminuant l'expression membranaire de la protéine ZO-1 [314]. Cependant, bien que dépendant également de la MLCK, cet effet était médié par l'induction d'une apoptose des cellules épithéliales.

2.4.4. Renouvellement épithélial et apoptose

Les protéases peuvent impacter le destin des cellules épithéliales de diverses manières. Comme l'ensemble des cellules, l'épithélium exprime des caspases intracellulaires dont l'activation initie les processus de mort cellulaire. Même si les données de la littérature sont contradictoires, les protéases sécrétées peuvent aussi influencer le destin des cellules épithéliales via leur signalisation. Au début des années 2000, les travaux de Dalila Darmoul ont mis en évidence un rôle pro-prolifératif de l'activation de PAR1 et de PAR2 dans plusieurs lignées épithéliales coliques d'origine cancéreuse [275], [291]. Paradoxalement, des

traitements à la thrombine chez des organoïdes humains conduisaient à une diminution de la prolifération cellulaire, associée à une augmentation de l'apoptose de manière dépendante de PAR1 et PAR4 [294]. Chez des organoïdes murins, une étude a montré que l'activation de PAR2 favorise la survie des progéniteurs épithéliaux tout en freinant leur prolifération via l'activation de la Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [178].

2.4.5. Régulation du microbiote

Notre équipe a récemment montré que la thrombine, initialement connue pour être synthétisée par le foie, est aussi exprimée par l'épithélium colique humain et murin [297]. De manière intéressante, cette protéase est sécrétée au pôle apical des cellules épithéliales et permet de maintenir les biofilms bactériens à distance de la muqueuse en clivant leurs protéines matricielles. Chez la souris, son inhibition dans la lumière intestinale entraîne l'apparition de dommages tissulaires associés à une translocation bactérienne accrue dans les tissus lymphoïdes mésentériques.

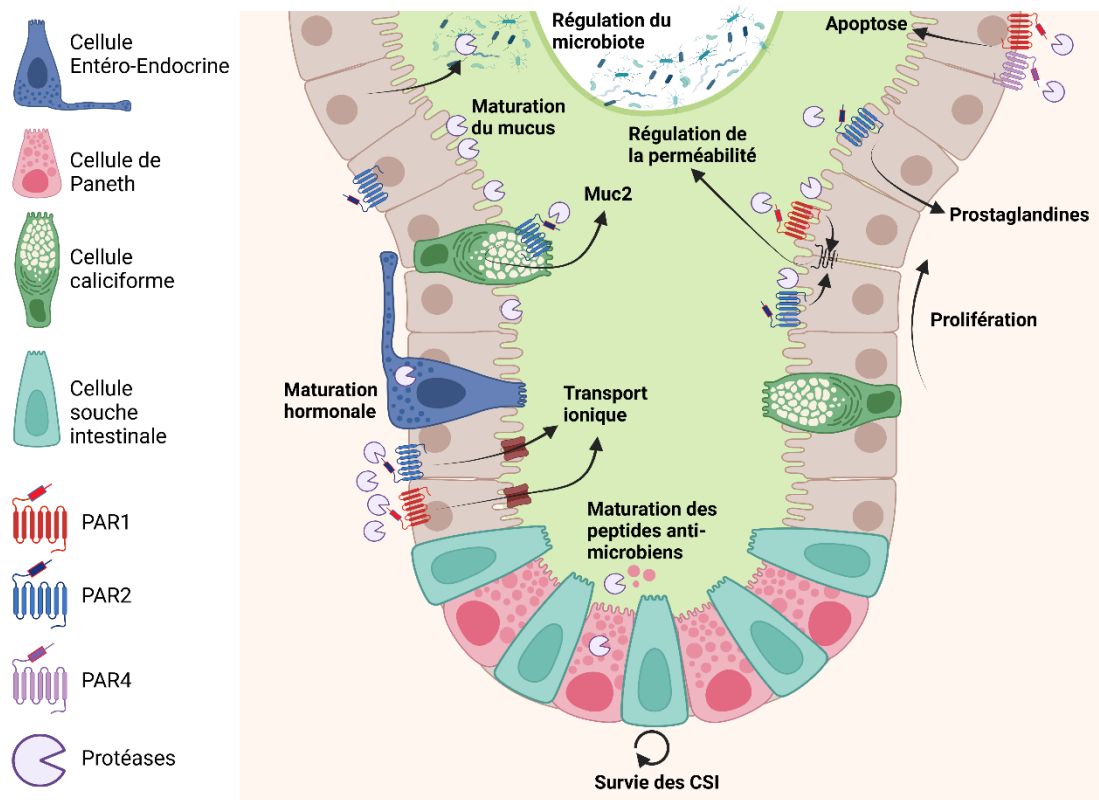


Figure 30: vue d'ensemble des fonctions de l'épithélium intestinal régulées par les protéases.

Figure créée avec Biorender.com.

2.5. Dérégulation de la balance protéolytique lors des MICI

De par leur large distribution cellulaire les protéases régulent des processus physiologiques majeurs. En condition physiologique, l'activité des protéases est strictement régulée par la production de leurs inhibiteurs, assurant un équilibre maîtrisé au sein des tissus : on parle de balance protéolytique. Cependant, de nombreux travaux ont décrit qu'en condition pathologique cette balance pouvait être déséquilibrée en faveur d'une activité protéolytique exacerbée. Une telle dérégulation est en particulier retrouvée lors des MICI, où une forte suractivation protéolytique dans des fèces ou des biopsies intestinales de patients a été rapportée [315], [316], [317], [318]. A l'inverse, l'expression de certains inhibiteurs de protéases comme l'élafine semble drastiquement diminuée lors des phases inflammatoires des MICI [209], [319]. L'activité protéolytique accrue résultant de ce déséquilibre est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques qui initient ou alimentent la réaction inflammatoire incontrôlée retrouvée lors des MICI et qui seront discutés dans cette partie.

2.5.1. Origine des protéases impliquées dans la physiopathologie des MICI

La dérégulation des protéases retrouvée dans les MICI met en jeu des enzymes aux origines multiples.

a) Protéases intracellulaires

Une production inappropriée de caspases est retrouvée dans la muqueuse des patients atteints de MICI. Parmi celles-ci, les caspases-1, 4 et 5 sont considérées comme des caspases pro-inflammatoires qui participent à la maturation de cytokines comme l'IL-18 et l'IL-1 β et sont toutes augmentées dans la muqueuse des patients souffrant de MICI [320], [321].

Le complexe ubiquitine-protéasome est un élément intracellulaire essentiel à la dégradation et au recyclage des protéines par clivage protéolytique. Une surexpression de plusieurs sous-unités catalytiques de ce complexe a été rapportée dans les tissus intestinaux

des patients atteints de MICI [322]. De plus, des études génétiques ont identifié 75 gènes codant pour des protéases comme des facteurs de risque pour la MC et 14 pour la RCH [323]. Parmi les gènes identifiés, les composants du complexe ubiquitine-protéasome étaient les plus représentés.

b) Protéases produites par le système immunitaire

L'inflammation intestinale est associée à l'infiltration de nombreuses cellules immunitaires. Parmi elles, les neutrophiles libèrent de nombreux médiateurs inflammatoires dont des protéases à sérine comme l'élastase du neutrophile, la protéinase-3 ou la cathepsine G [324]. Dans les biopsies issues de patients souffrant de MICI l'expression et l'activité élastolytique est drastiquement augmentée [209], [325]. D'autres cellules immunitaires, comme les mastocytes sécrètent des protéases dont la tryptase ou la chymase. Une augmentation du nombre de cellules exprimant la chymase a aussi été rapportée dans la muqueuse des patients atteints de MC [326].

c) Protéases microbiennes

Comme évoqué dans les chapitres précédents les MICI sont marquées par la présence d'une dysbiose intestinale. La capacité du microbiote à produire des protéases est connue depuis les années 1980 [327]. Cependant, la contribution des protéases microbiennes dans les MICI a longtemps été éludée de par le manque d'outils fiables permettant de différencier les protéases de l'hôte de celles du microbiote. L'une des premières bactéries productrices de protéases à avoir été associée au développement d'une colite est *Enterococcus faecalis*. Cette bactérie sécrète deux protéases nommées GelE et SprE et promeut le développement d'une colite chez des souris génétiquement prédisposées par la délétion du gène de l'IL-10 [328]. Plus récemment, une étude a réussi à établir un lien direct entre une activité de type élastase élevée dans les fèces de patients atteints de RCH et une abondance augmentée du taxa *Bacteroides vulgatus* [329]. Une fois isolées les *Bacteroides* issues des selles de patients produisaient une forte activité élastolytique. Dans cette même étude, des souris axéniques colonisées avec le microbiote de patients atteints de RCH montraient une augmentation de l'activité protéolytique fécale associée au développement d'un phénotype inflammatoire.

d) Protéases sécrétées par l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est une source d'enzymes protéolytiques qui semble particulièrement dérégulée lors des MICI. Tapias *et al.* ont montré d'une part, une augmentation de l'activité trypsique dans l'épithélium des MICI et d'autre part, que l'induction d'un stress du RE, largement retrouvée dans les MICI, induisait le relargage de trypsine par des lignées épithéliales coliques en culture [317].

Plus récemment, notre équipe a montré que l'épithélium colique humain exprimait de manière physiologique l'élastase 2A (*ELA2A*) et la thrombine [208], [297]. La production épithéliale de ces deux protéases est drastiquement augmentée dans l'épithélium colique des patients atteints de MICI. Lors de ces études, la surexpression épithéliale d'*ELA2A* chez la souris entraînait l'induction de dommages tissulaires comparables à ceux observés lors des MICI. De manière intéressante, l'apport exogène de l'inhibiteur de cette protéase (l'élafine) permet de diminuer la sévérité de colite expérimentalement induite chez la souris, montrant l'intérêt de cibler cette enzyme dans le contexte des MICI [209].

D'autre part, l'administration intra-colique de thrombine entraîne une colite chez la souris qui est significativement diminuée par l'utilisation d'un antagoniste de PAR1, faisant de l'axe Thrombine – PAR1 une autre cible potentielle dans le traitement de l'inflammation intestinale [318].

2.5.2. Rôles des protéases dans la physiopathologie des MICI

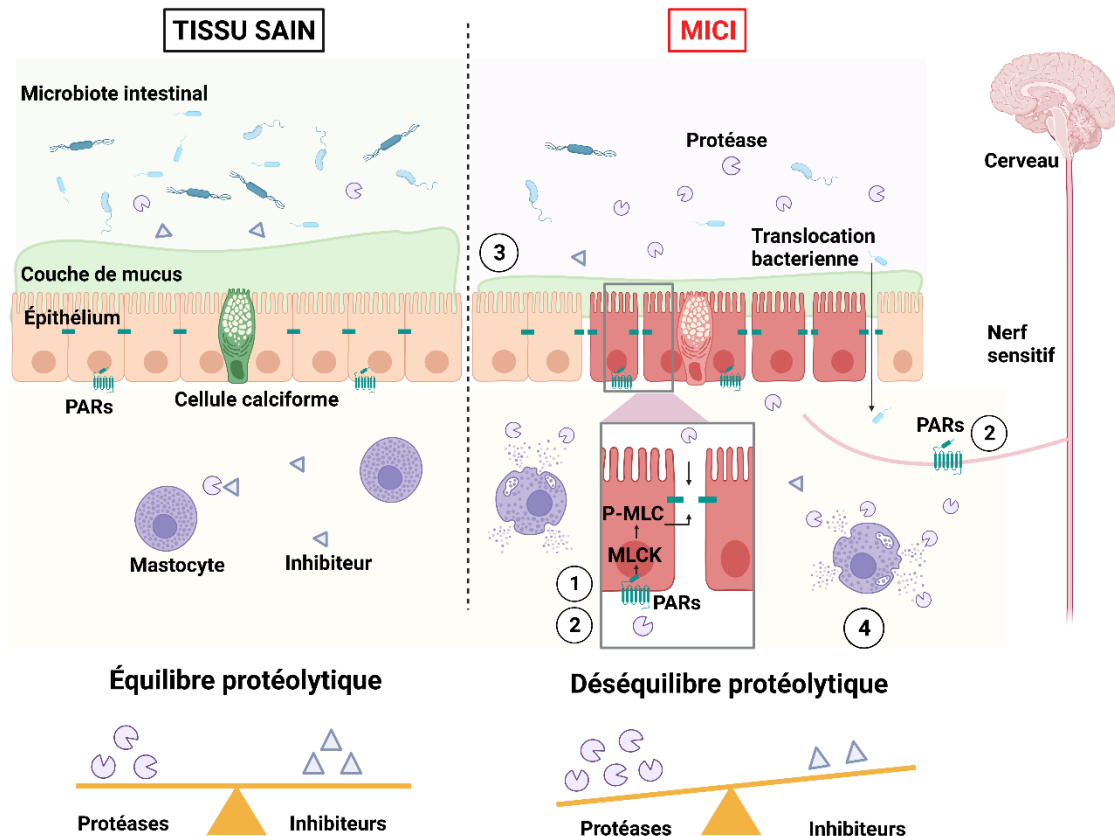


Figure 31: vue d'ensemble de la régulation des protéases en condition physiologique et de leurs implications dans la physiopathologie des MICI.

En condition basale (panel de gauche) les protéases assurent des fonctions physiologiques et leur activité est contrebalancée par la production d'inhibiteurs endogènes par le tissu intestinal. Lors des MICI en revanche (panel de droite), une augmentation du nombre et de l'activité des protéases produites par l'ensemble des composants intestinaux est retrouvée. Ces protéases peuvent participer à la physiopathologie de ces maladies en : (1) déstabilisant les jonctions cellulaires épithéliales par clivage, (2) activant les récepteurs PARs à la surface de nombreux types cellulaires, (3) dégradant la couche de mucus, (4) modulant l'activité des cytokines. MLCK : myosin light chain kinase ; P-MLC : MLCK phosphorylée. Figure adaptée de Mariaule *et al.* 2021 [330] et créée avec Biorender.com.

a) Régulation de la réponse inflammatoire par les protéases

De nombreuses preuves de l'implication des protéases et de leurs signaux dans la modulation de la réponse inflammatoire existent dans la littérature.

Un grand nombre de cytokines sont produites sous forme de précurseurs qui sont activés par clivage protéolytique extracellulaires. Padrines et collègues ont montré que l'élastase, la protéinase-3 et la cathepsine G produites par les neutrophiles sont capables de cliver la CX-CL8 (IL-8) [331]. Les formes tronquées de cette cytokine ont un pouvoir chimio-

attractant plus fort envers les neutrophiles, suggérant un effet d'auto-amplification de la réponse inflammatoire. Des processus similaires ont été décrits pour le TNF dont l'activité est augmentée par la métalloprotéase MMP-13, une protéase surexprimée dans les MICI [332]. Chez la souris, cette activation contribue aux dommages tissulaires observés dans un modèle de colite induite par le DSS (Sodium dextran sulfate), qui permet de mimer les atteintes retrouvées lors des MICI [195].

Certaines protéases peuvent aussi stimuler l'expression de cytokines. Il a par exemple été montré que l'élastase du neutrophile peut stimuler l'expression de la chimiokine CX-CL8 via une activation du récepteur TLR-4 [333]. Le mécanisme sous-jacent reste toutefois encore méconnu.

b) Implication des PARs dans l'inflammation intestinale

Les récepteurs PARs sont aussi des protagonistes importants dans les effets induits par l'hyperactivité protéolytique lors des MICI. Plusieurs études rapportent que l'expression de ces récepteurs peut être augmentée dans les tissus intestinaux de patients souffrant de ces pathologies [334], [335]. Cependant, les travaux menés chez le rongeur ont montré des effets différents de ces récepteurs selon le contexte inflammatoire observé.

Plusieurs études pointent vers un rôle pro-inflammatoire de PAR2 dans l'intestin. En condition physiologique, Cenac *et al.* ont montré que l'administration intra-colique d'activateurs de PAR2 induisait une inflammation aigüe de type Th1 chez la souris [289]. Ces travaux ont récemment été appuyés par le groupe de Nigel W. Bunnett qui ont aussi observé un rôle pro-inflammatoire de l'activation de PAR2 dans des explants de colons murins [265]. *In vitro*, l'activation de PAR2 à la surface de cellules épithéliales coliques HCT-15 induit la production de la chimiokine CX-CL8, pouvant être l'un des mécanismes mis en jeu par ce récepteur pour promouvoir l'inflammation [336]. Cependant, Fiorucci *et al.* ont aussi observé un effet protecteur de l'injection sous-cutanée du peptide agoniste de PAR2 (SLIGRL-NH₂), dans un modèle de colite chronique induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) chez la souris [337].

Des rôles pro-inflammatoires ont aussi été rapportés pour PAR1. Ce récepteur montre une activité pro-inflammatoire dans des modèles d'inflammations intestinales à profil

lymphocytaire de type Th1-Th17 comme le TNBS ou le DSS [338]. Dans cette étude, la sévérité de la colite était diminuée par l'administration d'antagonistes de PAR1. Dans des cas de MC pédiatriques, l'expression colique de PAR1 est positivement corrélée à l'expression de cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes Th17 (IL-17, IL-22) [334]. En revanche, PAR1 a été associé à des effets protecteurs vis-à-vis d'une colite de type Th2 chez la souris [339].

Ces différents éléments de la littérature mettent en évidence l'importance des signaux médiés par les PARs dans les mécanismes d'inflammation intestinale.

c) Protéases et perturbation de la barrière épithéliale dans les MICI

Comme évoqué dans les chapitres précédents, une perte de la fonction de barrière de l'épithélium est une caractéristique importante des MICI. Ce phénomène pourrait au moins en partie être expliqué par le tonus protéolytique dérégulé observé dans ces pathologies.

Dégradation des jonctions cellulaires et de la couche de mucus :

Certaines protéases dont l'activation est augmentée dans les MICI peuvent participer à la perte de la fonction barrière de l'épithélium en dégradant directement ses jonctions intercellulaires. La chymase, produite par les mastocytes, altère par exemple la présence à la membrane des protéines de jonctions serrées occludine et ZO-1 [340]. Autre exemple, la protéase microbienne GelE produite par *Enterococcus faecalis* augmente la perméabilité épithéliale chez la souris en dégradant la protéine jonctionnelle E-cadhérine [341]. Les MICI ont souvent été associées à une surabondance de souches d'*E.coli* pathogènes. Ces bactéries sécrètent des facteurs de virulence comme la protéase Pic qui clive efficacement les mucines et facilite donc l'invasion de la muqueuse par ces pathogènes [342].

Activation de la signalisation des PARs :

De nombreuses études relient l'augmentation de la perméabilité induite par les protéases à la signalisation des PARs. Dabek *et al.* ont montré que des explants coliques de souris exposés à des surnageants fécaux issus de patients atteints de MICI présentaient une perméabilité paracellulaire augmentée [343]. Cette augmentation était dépendante de l'activation de PAR4 par la cathepsine G présente dans ces surnageants et a plus tard été

confirmée *in vivo* [344]. D'un point de vue mécanistique, la signalisation de PAR4 induisait l'activation de la kinase MLCK, qui déclenche la contraction du cytosquelette des cellules épithéliales et l'ouverture des jonctions serrées comme décrit précédemment dans ce manuscrit. Pour rappel, un mécanisme similaire a été impliqué dans l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par PAR2 *in vivo* [313].

d) Protéases et douleur viscérale

L'un des signes cardinaux des processus inflammatoires est la douleur et les MICI n'échappent pas à la règle. En effet, près de 50 à 70 % des patients en situation de poussée inflammatoire éprouvent des douleurs abdominales [345]. Ces processus sont causés par une activation anormale des fibres sensibles innervant le tractus digestif dont les corps neuronaux sont regroupés dans les ganglions de la racine dorsale (DRG). Les protéases, via leurs récepteurs, constituent des médiateurs majeurs des signaux douloureux liés à l'inflammation. Les PARs ont cependant des effets opposés dans la nociception :

- L'activation de PAR2 est associée à des effets pro-nociceptifs. Les macrophages activés en condition inflammatoire relarguent de grandes quantités de cathepsine S. Dans un modèle de colite chez la souris, cette protéase active les nocicepteurs viscéraux via PAR2 [346]. L'administration intra-colique du peptide agoniste de PAR2 SLIGRL-NH₂ a aussi été reliée à l'induction d'une douleur viscérale chez le rat [311].
- PAR1 et PAR4 ont quant à eux des effets anti-nociceptifs dans des modèles de douleur chez le rongeur [347], [348]. PAR1 est pourtant capable d'activer des neurones sensitifs humains en culture [284].
- Concernant PAR3 qui est très exprimé dans les neurones, une étude récente a montré sa capacité à induire une signalisation calcique dans des neurones sensitifs murins, associés à des phénomènes douloureux [241].

L'ensemble des éléments présentés dans ce chapitre mettent en exergue l'importance des protéases et de leur signalisation dans l'homéostasie intestinale. Ces enzymes sont produites par l'ensemble des acteurs du système digestif et participent à des fonctions physiologiques importantes. En revanche, une dérégulation de leur activité concourt activement aux atteintes retrouvées dans certaines pathologies comme les MICI. A ce titre, elles sont perçues comme des cibles thérapeutiques importantes. Néanmoins, la compréhension du rôle des différentes protéases retrouvées au niveau intestinal reste incomplète et il est donc primordial de caractériser l'ensemble des acteurs protéolytiques du tractus gastro-intestinal.

Chapitre 3 : la chymotrypsine, une simple protéase digestive ?

Les chymotrypsines sont des protéases majeures des sécrétions pancréatiques et l'étude de leurs fonctions extra-digestives a fait l'objet de mon projet de thèse.

3.1. Introduction aux protéases pancréatiques

Le pancréas possède une fonction endocrine assurée par les ilots de Langerhans et une fonction exocrine assurée par les acini pancréatiques (Figure 32). La partie exocrine du pancréas est responsable de la sécrétion de plusieurs litres de sucs pancréatiques par jour qui sont déversés dans la lumière duodénale afin d'assurer la digestion des aliments [349]. Cette sécrétion n'est pas continue. Elle est stimulée lors des phases de prises alimentaires par un ensemble d'arcs réflexes incluant des médiateurs humoraux et neuronaux. L'une des hormones majeures de cette régulation est la cholécystokinine, sécrétée par les cellules entéro-endocrines de l'intestin grêle lors de l'arrivée du bol alimentaire. Cette hormone stimule la sécrétion des sucs pancréatiques par les cellules acineuses en agissant par voie endocrine et en activant des voies neuronales cholinergiques [350].

Les sucs pancréatiques contiennent une importante activité enzymatique dont la plus grande part est assurée par des protéases, afin de cataboliser la diversité des protéines ingérées [351]. Les protéases à sérine sont les plus abondantes et représenteraient plus de 30 % du protéome des sucs digestifs [351] (Figure 33). Parmi ces protéases à sérine on retrouve dans l'ordre d'abondance : des trypsines, des chymotrypsines et des élastases [352], [353]. Les chymotrypsines représentent plus de 9% des protéines totales du suc pancréatique, en faisant l'une des enzymes pancréatiques les plus abondantes [354].

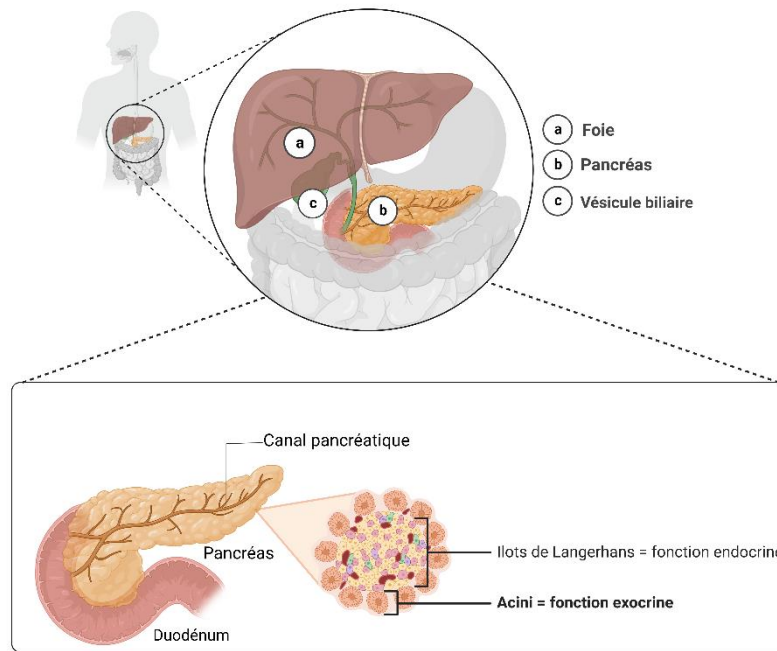


Figure 32: anatomie et organisation tissulaire du pancréas.

Le pancréas est une glande mixte, ayant à la fois une fonction exocrine et endocrine. La fonction endocrine est assurée par les ilots de Langherans produisant des hormones qui rejoignent la circulation sanguine. La fonction exocrine est assurée par les cellules acineuses regroupées en acini qui forment une lumière centrale. Les acini produisent d'importantes quantités d'enzymes digestives, dont des protéases. Ils sont drainés par des canaux intercalaires qui rejoignent le canal pancréatique par lequel les sécrétions se déversent dans la lumière du duodénum. Image créée avec Biorender.com.

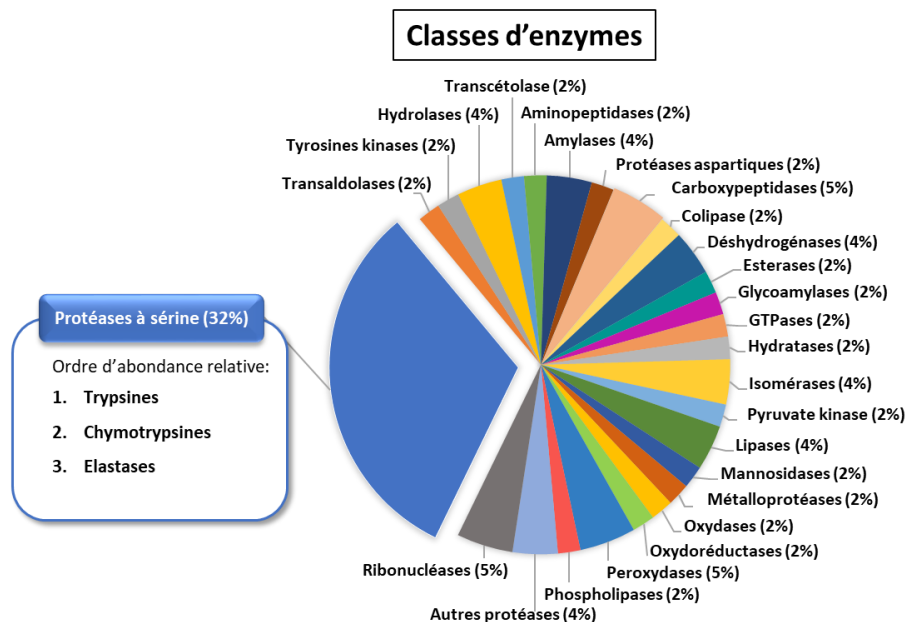


Figure 33: abondance relative des protéases au sein des sucs pancréatiques humains.

Figure adaptée de Grønberg et al. 2004 [321].

3.2. Les chymotrypsines : découverte et relation structure-activité

Avant tout développement il convient de différencier les chymotrypsines des autres protéases partageant des préférences de substrats similaires et qui font partie des « chymotrypsine-like » aussi appelées protéases à activité de type chymotrypsique. Dans la suite de ce document nous nous concentrerons uniquement sur les protéases qui portent historiquement le nom de chymotrypsine et qui ont toutes été identifiées dans le pancréas. Dans un souci de simplification du message, le terme « la chymotrypsine » sera parfois employé dans la suite de ce manuscrit afin d'englober toutes les isoformes de cette enzyme, sans distinction.

3.2.1. Structure du chymotrypsinogène et mécanisme d'activation

Pour éviter la dégradation du tissu pancréatique, toutes les protéases des sucs pancréatiques sont synthétisées sous la forme de proenzymes (ou zymogènes) qui ne sont activées qu'à leur arrivée dans la lumière duodénale [353]. Leur activation intestinale peut être visualisée comme une réaction en chaîne (Figure 34A). Elle est initiée par l'entérokinase, une protéase transmembranaire des entérocytes qui active le trypsinogène par clivage. La trypsine active ainsi obtenue est à l'origine de l'activation de la plupart des autres protéases pancréatiques, dont la chymotrypsine. Les explications mécanistiques décrites dans cette section se concentreront sur la chymotrypsine B, qui représente la forme pancréatique majoritaire de cette enzyme et la mieux caractérisée.

La forme proenzyme de la chymotrypsine B est appelée chymotrypsinogène B. Elle est initialement composée d'une chaîne de 263 acides aminés contenant [353] :

- **Un peptide signal** de 18 acides aminés qui prédit sa sécrétion,
- **Un peptide activateur ou propeptide** de 15 acides aminés en position N-terminale,
- **La partie active de la chymotrypsine** composée d'une longue séquence de 230 résidus.

Le peptide signal du chymotrypsinogène est clivé lors de sa sécrétion, donnant une protéine de 245 acides aminés.

Contrairement à une activation classique qui consiste en l'élimination totale du propeptide N-terminal qui bloque l'accès à la poche catalytique de l'enzyme, la maturation du chymotrypsinogène se fait par deux éliminations successives de 2 acides aminés internes comme décrit ci-dessous [190] (Figure 34B) :

- La première étape d'activation du chymotrypsinogène est le clivage de la partie propeptide par la trypsine, entre les résidus Arg¹⁵/Ile¹⁶, qui reste néanmoins liée au reste de l'enzyme par un pont disulfure. Cette rétention stabilise la chymotrypsine, lui donnant une plus grande résistance contre les variations de pH, de chaleur ou la dégradation par d'autres protéases [355]. L'intermédiaire formé à la fin de cette première étape est nommé π -chymotrypsine, est déjà partiellement actif.
- La deuxième étape est obtenue par autolyse dans laquelle une molécule de π -chymotrypsine en clive une autre au niveau de trois sites de clivage : Leu¹³/Ser¹⁴, Tyr¹⁴⁶/Thr¹⁴⁷ et Asn¹⁴⁸/Ala¹⁴⁹. Cela aboutit à la forme finale de l'enzyme nommée α -chymotrypsine, bien plus stable et active que l'intermédiaire π . Cette forme mature est composée de 3 chaînes reliées par 5 ponts disulfures [356]. Cette enzyme est maintenant capable d'hydrolyser de nombreux substrats selon un schéma réactionnel illustré en section 2.1.1 du chapitre 2.

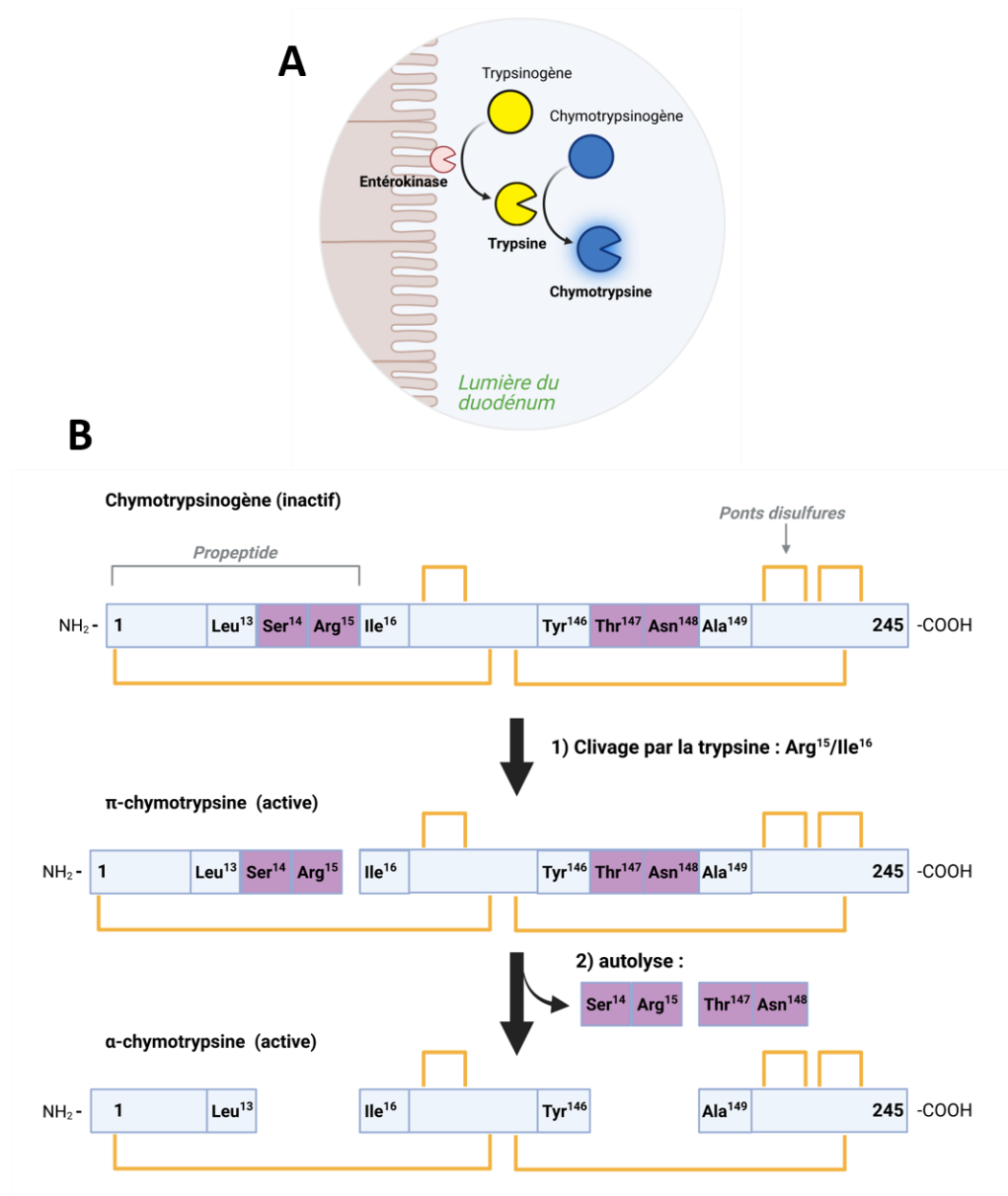


Figure 34: mécanisme d'activation du chymotrypsinogène par la trypsine.

(A) Réaction en chaîne menant à l'activation du chymotrypsinogène dans la lumière intestinale. Les proenzymes sécrétées par le pancréas sont activées dans le duodénum. Les cellules épithéliales intestinales expriment une protéase à leur membrane, l'entérokinase, qui convertit le trypsinogène en trypsine active par clivage. La trypsine active à son tour un grand nombre d'enzymes pancréatiques en les clivant, dont la chymotrypsine. (B) Mécanisme d'activation du chymotrypsinogène. L'activation du chymotrypsinogène se déroule en deux grandes étapes :

1) le clivage au niveau du site Arg¹⁵/Ile¹⁶ par la trypsine sépare la partie propeptide de l'extrémité N-terminale du chymotrypsinogène. Elles restent tout de même liées par un pont disulfure. Cette séparation entraîne un changement conformationnel de l'enzyme menant à la formation de la poche catalytique et du site actif de l'enzyme. L'intermédiaire formé à cette étape possède une activité catalytique et est nommé π -chymotrypsine.

2) La π -chymotrypsine subit ensuite une autolyse au niveau de trois sites de clivages : Leu¹³/Ser¹⁴, Tyr¹⁴⁶/Thr¹⁴⁷ et Asn¹⁴⁸/Ala¹⁴⁹. Cette ultime étape de maturation mène à la forme finale de l'enzyme nommée α -chymotrypsine, bien plus stable et active que l'intermédiaire π . Elle est composée de 3 chaînes polypeptidiques reliées par 5 ponts disulfures.

Figures adaptées de Palmer et Bonner 2011 et créées avec Biorender.com.

3.2.2. Description des différentes formes de chymotrypsine

a) La chymotrypsine B

C'est à partir d'extrait pancréatique bovin que la première forme de chymotrypsine nommée « A » a été découverte et cristallisée par Kunitz et Northrop en 1935 [357]. Laskowski découvre plus tard l'existence d'une seconde forme dans le pancréas bovin, qui sera renommée B [358]. Ces deux protéines sont codées par deux gènes différents, mais possèdent une haute homologie de séquence (environ 80 %) et clivent toutes deux les liaisons peptidiques de manière préférentielle après des aminés aromatiques et aliphatiques : tyrosine, phénylalanine, tryptophane, leucine et méthionine [359]. Comme la plupart des protéases, les chymotrypsines peuvent aussi accepter d'autres acides aminés en fonction de la disponibilité des substrats et de leur environnement, mais avec une efficacité moindre.

La chymotrypsine A n'existe pas chez l'Homme et le rongeur, mais des orthologues de la chymotrypsine B (CTRB) ont été identifiés chez ces organismes [360], [361]. Contrairement au rongeur, deux gènes paralogues de la chymotrypsine B (CTRB) sont exprimés dans le pancréas humain : *CTRB1* et *CTRB2* [360]. Ils sont localisés au niveau d'un même locus sur le chromosome 16. En condition physiologique, le transcrit *CTRB1* est majoritairement exprimé par rapport au *CTRB2* [362]. Les deux protéines partagent plus de 98% d'homologie, mais la présence d'un résidu Arg en position 236 chez la *CTRB2* lui confère une plus grande activité que la *CTRB1* [363]. Jancsó *et al.*, ont montré que la délétion du gène *Ctrb1* chez la souris conduisait à une diminution de plus de 90% de l'activité chymotrypsique d'origine pancréatique [364]. La CTRB est donc la forme extrêmement majoritaire de chymotrypsine dans cet organe. Elle reste à ce jour la forme la mieux caractérisée de cette famille, sa forme active est une protéine globulaire d'environ 25 kDa et sa triade catalytique est formée par le rapprochement dans l'espace des résidus Ser⁹⁵, His⁵⁷ et Asp¹⁰².

En plus de la CTRB qui est la chymotrypsine la plus étudiée, deux autres protéases ont été directement assimilées à des isoenzymes de chymotrypsine dans la littérature. Les différentes formes de chymotrypsines connues à ce jour, leur homologie et leur expression chez l'Homme et le rongeur sont résumées en Tableau 4.

Tableau 4: comparaison des formes de chymotrypsine chez l'Homme et la souris.

Formes de chymotrypsine	Substrats préférentiels*	Expression chez la souris ou l'Homme	% d'homologie avec la CTRB1 humaine	Ordre d'abondance relative dans le pancréas
CTRB1	Tyr, Phe, Trp	Homme, souris	-	1
CTRB2	Tyr, Phe, Trp	Homme	98	2
CTRC	Leu, Tyr, Phe, Met, Gln, Asn	Homme, souris (mais absente chez la souche C57BL/6)	42	3
CTRL	Tyr, Phe, Trp, Leu	Homme, souris	55	4

*En gras : les résidus clivés avec le plus d'affinité par chaque protéase.

b) La chymotrypsine C (CTRC)

En 1965 Folk et collègues isolèrent une nouvelle protéase du pancréas porcin qu'ils nommèrent chymotrypsine C (CTRC) de par son homologie de substrat avec les chymotrypsines A et B [365]. Des orthologues de cette enzyme ont depuis aussi été identifiés chez le rat et l'humain [366], [367]. Sa protéine n'est cependant pas exprimée chez la souris C57BL/6 en raison d'une délétion nucléotidique dans l'un de ses exons [368].

Malgré une spécificité de substrats équivalente, cette protéase d'environ 28 kDa présente quelques différences avec les autres chymotrypsines. En effet, elle possède tout juste 40% de similarité avec la séquence de la CTRB. De plus, son gène est situé sur le chromosome 1p36.21, proche des gènes de l'élastase 2A et 2B, avec qui elle partage d'ailleurs plus d'homologie [369]. Cette forme de chymotrypsine semble minoritaire dans le pancréas en comparaison avec la CTRB [370].

c) La « chymotrypsin-like protease » (CTRL)

La dernière isoenzyme chymotrypsique à avoir été identifiée est la « chymotrypsin-like protease » (CTRL). Découverte chez le rat, cette protéase a été associée à une isoenzyme de la CTRB de par sa haute affinité pour les substrats phénylalanines [371].

Cette protéase pancréatique de 26 kDa ne possède que 40 à 55% d'homologie avec les autres isoenzymes chymotrypsiques [372], [373]. La CTRL semble être une forme extrêmement minoritaire de chymotrypsine. En effet, Mosztbacher et collègues ont montré que la délétion du gène *Ctrl* chez la souris diminuait d'à peine 10% l'activité chymotrypsique

totale d'extraits pancréatiques activés [373]. La CTRL est l'isoenzyme de chymotrypsine la moins bien caractérisée et aucun rôle physiologique précis ne lui été rapporté jusqu'à présent.

3.3. Régulation de l'activité de la chymotrypsine dans le tractus digestif

A l'image des autres enzymes digestives, l'activité de la chymotrypsine n'est pas retrouvée de manière homogène le long du tractus intestinal. Son activité est la plus haute au niveau du duodénum, lieu de son activation. Elle diminue ensuite légèrement le long de l'intestin grêle mais reste très active dans l'iléon [374]. Dans l'intestin grêle, le chyme alimentaire et les protéases digestives se retrouvent en contact avec la muqueuse, comme en atteste l'activation du trypsinogène à la surface de l'épithélium évoquée précédemment. D'anciennes études ont même montré que de la chymotrypsine exogène pouvait s'adsorber à la surface d'explants iléaux humains tout en conservant son activité, mettant en évidence la capacité de cette enzyme à interagir avec les cellules épithéliales [375]. Comme pour l'ensemble des protéases pancréatiques, l'activité chymotrypsique chute brutalement dans le colon sans toutefois disparaître [374]. Cette activité est présente dans les matières fécales humaines et a même été proposée comme un marqueur de la fonction exocrine du pancréas car elle est diminuée chez les patients atteints d'insuffisance pancréatique [376], [377].

La diminution progressive de l'activité des protéases pancréatiques le long de l'intestin peut être expliquée par trois phénomènes différents non mutuellement exclusifs :

- L'auto-dégradation ou la dégradation mutuelle des protéases pancréatiques a été l'un des premiers mécanismes avancés. Certaines formes de chymotrypsines sont par exemple capables de s'autolyser ou de dégrader efficacement la trypsine pancréatique [378], [379].
- La production d'inhibiteurs de protéases par le tissu digestif (SLPI, élafine), décrite en section 2.2 du chapitre 2.
- L'inactivation des enzymes pancréatiques est aussi fortement associée à l'abondance du microbiote dans le colon. En effet, l'activité protéolytique fécale chez des souris axéniques ou des patients humains sous antibiothérapie est fortement augmentée en

comparaison à des individus sains [380], [381]. Ce phénomène pourrait être expliqué par la capacité de certaines bactéries commensales à produire des inhibiteurs de protéases comme les serpins [198].

3.4. La chymotrypsine : une enzyme essentiellement pancréatique ?

Depuis sa découverte, la chymotrypsine est uniquement considérée comme une enzyme produite par le pancréas.

Toutefois, en 1998, Wang *et al.* ont décrit avoir identifié une expression extra-pancréatique de la CTRB chez le rat [382]. Cette publication décrivait la détection de l'ARNm de la *Ctrb* dans l'estomac, le jéjunum, la rate et les testicules par Northern blot. Au niveau protéique, cette expression était spécifiquement retrouvée dans la muqueuse des organes digestifs. Ainsi, par immunofluorescence, les auteurs rapportaient alors l'expression de cette chymotrypsine dans de rares cellules parsemées au sein de l'épithélium gastrique et intestinal et dont l'identité demeure inconnue (Figure 35). Ces cellules étaient d'aspect triangulaire, granuleux et alors qualifiées de « neuroendocrine-like ».

A notre connaissance, cette publication représente la seule étude décrivant une possible expression extra-intestinale de la CTRB par l'épithélium digestif. Ces résultats n'ont jamais été confirmés depuis mais pourraient suggérer de nouveaux rôles physiologiques de la chymotrypsine au sein du tractus digestif.

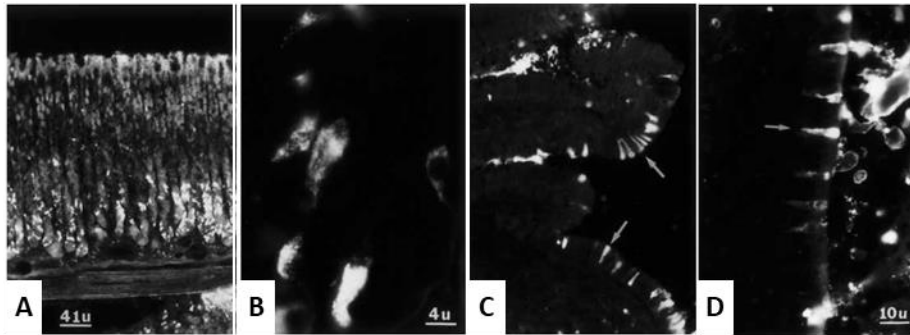


Figure 35: images représentatives des cellules immuno-positives à la CTRB dans l'épithélium gastrique et intestinal telles que rapportées par Wang *et al.* en 1998 chez le rat.

(A-B) Images représentatives de l'immunomarquage CTRB retrouvé dans la muqueuse gastrique, respectivement à faible et fort grossissement. (C-D) Images représentatives de l'immunomarquage CTRB retrouvé dans l'épithélium de l'intestin grêle, respectivement à faible et fort grossissement [382].

3.5. Implications extra-digestives de la chymotrypsine

La chymotrypsine exerce une fonction digestive majeure. Cependant, quelques études lui attribuent aussi des propriétés extra-digestives particulièrement intéressantes.

3.5.1. Fonctions extra-digestives de la chymotrypsine endogène

a) Protection contre la pancréatite : contrôle de l'activité du trypsinogène

La pancréatite est une inflammation du pancréas d'origine multifactorielle, associant souvent une prédisposition génétique à des habitudes de vie inadaptées (tabagisme, consommation d'alcool). L'un des événements précoces de la pancréatite est l'activation du trypsinogène à l'intérieur même des acini pancréatiques, conduisant à l'autodigestion du tissu [383]. Des études d'associations génétiques chez l'Homme ont permis d'identifier que la CTRB et la CTCRC jouent un rôle protecteur dans cette pathologie. Une mutation « perte de fonction » du gène de la CTCRC a par exemple été associée à une augmentation du risque de pancréatite [384]. Ce rôle protecteur est dû à la grande capacité des chymotrypsines à dégrader le trypsinogène, qui les distingue des autres protéases comme les élastases n'ayant pas cette faculté [329], [351]. En condition physiologique, les capacités d'auto-activation du trypsinogène génèrent une faible activité trypsique au sein des acini, ce qui active à son tour le chymotrypsinogène. Les chymotrypsines ainsi néo-activées dégradent en retour les stocks

de trypsinogènes, évitant ainsi leur trop forte activation et donc la survenue de dégâts tissulaires causés par la trypsine [386]. Le rôle protecteur de la CTRB et de la CTRC vis-à-vis de la pancréatite a été confirmé dans des modèles murins de pancréatite aiguë et chronique induite par administration de céruléine [364], [368].

b) Implication de la chymotrypsine dans la régulation de la perméabilité intestinale

Les protéases ont souvent été étudiées pour leurs effets délétères vis-à-vis de la barrière épithéliale intestinale. De manière intéressante, Swystun *et al.* ont pourtant suggéré que la chymotrypsine pourrait avoir un effet bénéfique sur la fonction barrière de l'épithélium [387]. Dans ces travaux, le pôle apical de cellules épithéliales intestinales SCBN cultivées sur une membrane poreuse a été exposé à différentes protéases à sérine : l'élastase, la trypsine ou la chymotrypsine. Ces trois enzymes ont provoqué une diminution de la perméabilité paracellulaire aux ions et au marqueur fluorescent FITC-Dextran. L'effet observé était médié par l'activation d'une signalisation intracellulaire conduisant à une augmentation de l'expression de l'occludine au niveau des jonctions serrées. Cependant la cible cellulaire utilisée par les protéases pour déclencher cet effet n'a pas été identifiée et ne dépendait pas des récepteurs PARs.

3.5.2. Apports exogènes de chymotrypsine : une protéase anti-inflammatoire ?

En dehors de ses fonctions intestinales, l'apport exogène de chymotrypsine a aussi été associé à des effets anti-inflammatoires dans la littérature.

Des preuves de l'effet bénéfique de cette enzyme lors de troubles inflammatoires divers remontent aux années 1960. Sarkar *et al.* ont par exemple montré que des injections intramusculaires de chymotrypsine lors d'une d'inflammation pleurale diminuaient significativement la taille des œdèmes chez le rat [388]. Les limites des techniques de l'époque n'ont pas permis d'identifier précisément le mécanisme impliqué mais les auteurs suggéraient une possible action à distance de la chymotrypsine via l'activation de facteurs sanguins non identifiés. Il est aussi intéressant de noter qu'en Inde, des préparations à base de trypsine et

de chymotrypsine sont utilisées en clinique pour réduire l'inflammation et favoriser la cicatrisation des plaies traumatiques ou post-opératoires [389].

Plus récemment, l'administration intrarachidienne de chymotrypsine a été montrée comme ayant des vertus protectrices dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez le rat [390]. L'EAE est un modèle utilisé pour étudier la physiopathologie de la sclérose en plaque, une maladie auto-immune affectant le système nerveux central. Cette maladie, dont l'étiologie est encore mal connue, est caractérisée par l'apparition de lymphocytes de types Th1 auto-réactifs dirigés contre la myéline, une membrane lipoprotéique entourant certaines fibres nerveuses. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'injection d'une solution de chymotrypsine pancréatique bovine à 0,2 mg/mL réduisait significativement la sévérité de l'encéphalomyélite. Cet effet bénéfique était associé à une diminution de l'expression d'IFN γ produite par les lymphocytes Th1. Au contraire, les marqueurs de lymphocytes Th2 (IL-4) et T régulateurs (Foxp3), une population importante pour le contrôle de la réponse immunitaire, étaient significativement augmentés. Les mécanismes sous-jacents n'ont cependant pas été explorés dans cette étude.

En résumé, la chymotrypsine est donc une protéase digestive retrouvée de manière abondante dans la lumière intestinale. Sa seule fonction digestive est cependant remise en question par certaines données de la littérature lui attribuant des fonctions protectrices des tissus et questionnant sa seule expression pancréatique. De plus, en dehors de la digestion des aliments, ses implications dans l'homéostasie intestinale et sa capacité à induire des signaux cellulaires restent largement méconnus. En particulier, l'aptitude de la chymotrypsine à induire une signalisation via les récepteurs PARs n'a jamais été décrite jusqu'ici.

Hypothèse générale et objectifs du projet de thèse

La lumière intestinale est fortement exposée aux enzymes protéolytiques, pouvant provenir des sécrétions pancréatiques, des bactéries du microbiote ou des cellules de la muqueuse de l'hôte. Ces enzymes jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale en assurant des fonctions très variées.

Parmi les protéases luminales, la chymotrypsine est l'une des enzymes pancréatiques les plus abondantes [353]. Son activité est retrouvée tout au long du tractus intestinal jusqu'au niveau fécal et d'anciennes études ont montré la capacité de la chymotrypsine à s'adsorber à la surface d'explants iléaux humains [375]. Ces données soulèvent la question de potentielles interactions entre cette enzyme et les cellules épithéliales.

Bien que les fonctions digestives de la chymotrypsine soient connues depuis longtemps, ni ses effets potentiels sur l'environnement intestinal, en particulier sur l'épithélium, ni ses interactions potentielles avec les Récepteurs Activés par les Protéases (PARs) n'ont été envisagés jusque-là. Dans ce contexte, **notre hypothèse générale est que la chymotrypsine pourrait influencer la physiologie intestinale, notamment en interagissant avec l'épithélium.** Parmi les mécanismes possibles, nous pensons que la chymotrypsine pourrait réguler l'activation des récepteurs PARs exprimés par les cellules épithéliales intestinales.

A la lumière de ces éléments, mon projet de thèse s'est articulé autour de quatre axes de recherche :

1. Étude pharmacologique de l'interaction entre la chymotrypsine et les récepteurs PARs.

Le clivage protéolytique des récepteurs PARs est l'un des mécanismes moléculaires par lequel les protéases régulent la physiologie intestinale. Notre objectif était de caractériser la capacité de la chymotrypsine à cliver et à activer ou non les différents PARs. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs approches *in vitro* pour explorer le clivage de ces récepteurs par la chymotrypsine. Les cellules épithéliales intestinales exprimant fortement PAR1 et PAR2, nous avons ensuite mené une étude pharmacologique de la signalisation calcique et MAPK induite par la chymotrypsine en aval de ces récepteurs. Les résultats de ces travaux ont donné lieu à la soumission d'un article scientifique dans le *British Journal of Pharmacology*, actuellement en cours de révision.

2. Caractérisation des effets biologiques de la chymotrypsine sur l'épithélium intestinal.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des effets de la chymotrypsine sur l'épithélium intestinal, nous avons utilisé des organoïdes coliques humains que nous avons traités avec de la chymotrypsine. Nous avons mené un ensemble d'analyses transcriptionnelles et morphologiques à partir de ces cultures afin de caractériser des fonctions clés des cellules épithéliales potentiellement affectées par notre enzyme d'intérêt (prolifération, différenciation, fonction barrière...). Enfin, l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique de PAR2 nous a permis de déterminer l'implication de ce récepteur dans les effets induits par la chymotrypsine.

3. Régulation de l'activité chymotrypsique fécale chez les patients atteints de MICI.

Nous avons ensuite questionné comment l'activité chymotrypsique est régulée en contexte physiopathologique tel que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin. Pour cela, nous avons exploré la régulation de cette activité à partir d'échantillons fécaux issus d'une cohorte de donneurs sains et de patients atteints de MICI. En corrélant nos résultats avec les données cliniques des patients, l'objectif de cette étude était d'évaluer si le taux de chymotrypsine fécale pouvait être un marqueur de l'état inflammatoire des MICI.

4. Etude exploratoire d'une expression endogène de la chymotrypsine par la muqueuse gastro-intestinale.

Dans la littérature, une ancienne étude a rapporté une expression extra-pancréatique de la chymotrypsine B chez le rat, notamment au niveau gastrique et intestinal [382]. L'épithélium intestinal étant capable de produire un large panel de protéases à sérine, nous avons questionné une potentielle expression extra-pancréatique de la chymotrypsine, par la muqueuse digestive. Nos investigations nous ont amenés à analyser l'expression des différentes formes de chymotrypsine par le compartiment épithélial tout au long du tractus gastro-intestinal, à partir d'échantillons murins et humains.

Matériels et méthodes

Réactifs

Tous les réactifs ont été préparés selon les recommandations des fournisseurs. L'ensemble des réactifs utilisés sont soit décrits au fur et à mesure des différents paragraphes de cette section, soit inclus dans le matériel et méthodes de l'article Guignard *et al.* présenté en partie 1 des résultats.

Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été menées conformément à la législation européenne sur la recherche animale et aux directives ARRIVE 2.0. L'ensemble des souris utilisées au cours de ces expériences sont des C57BL/6J mâles de 8-12 semaines élevées en cages ventilées (5 souris maximum/cage) dans une zone spécifique exempte d'agents pathogènes au sein du CREFRE US006/INSERM (Toulouse).

Les échantillons issus de souris C57BL/6 déficientes pour le gène *Ctrb1* (*Ctrb1*-KO) ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr. Miklós Sahin-Toth (UCLA, USA). La lignée de souris *Ctrb1*-KO a été générée comme décrit dans Jancsó, Hegyi, et Sahin-Tóth 2018 [364].

Préparation des échantillons murins

Pour les analyses histologiques : des morceaux de foie, de pancréas ainsi que des segments d'iléon, de colon et de corps d'estomac ont été prélevés et fixés (formol 4%, Sigma-Aldrich) pendant 24h, puis transférés dans de l'éthanol (70%) et gardés à 4°C jusqu'à l'inclusion des organes en paraffine. Pour les analyses moléculaires, les différents segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et le colon des souris ont été prélevés séparément, lavés avec 20 mL de PBS, puis ouverts longitudinalement. La muqueuse humide a été récupérée par grattage avec une lame de microscopie en verre et ces échantillons ont été congelés à sec, en azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Des segments de zone non glandulaire, de corps et d'antrum gastrique ont été prélevés, puis congelés tels quels en azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Mise en culture de neurones murins de la racine dorsale

Après euthanasie, la colonne vertébrale des souris a été disséquée et transférée sur glace, les ganglions de la racine dorsale (DRG, pour Dorsal Root Ganglions) ont été prélevés sous loupe binoculaire et lavés 2 fois avec du tampon HBSS. A ce stade, les DRG ont été soit repris en TRI Reagent® et stockés à -80°C pour une analyse transcriptionnelle ultérieure ou dissociés pour une mise en culture immédiate. La dissociation a été réalisée par voie enzymatique, débutant par 10 min d'incubation à 37°C dans une solution de papaïne à 27 µg/mL (Sigma-Aldrich) diluée dans une solution de L-Cystéine à pH 7.4 (Sigma Aldrich). La réaction enzymatique a été arrêtée par ajout de 5 mL de milieu Leibovitz's L15 (Thermo Fisher Scientific), supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF). Après trois lavages au HBSS, les DRG ont été incubés 10 min à 37°C dans une solution d'HBSS contenant 4 mg/mL de dispase II et 1 mg/mL de collagénase de type I (Sigma Aldrich). La dissociation a été finalisée mécaniquement à l'aide d'une micropipette de 200 µL avant de stopper la réaction enzymatique par ajout de 10 mL de milieu Leibovitz's L15 (Thermo Fisher Scientific) contenant 10% de SVF.

La suspension cellulaire a ensuite centrifugée à 1000 g - 5 min, puis le culot repris dans 1 mL de milieu « Dulbecco's modified eagle's medium » (DMEM, Gibco) additionné de 3 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels (NEAA) 100 U/mL de pénicilline/streptomycine. Ce milieu a été également supplémenté avec des inhibiteurs de mitose afin d'éviter la prolifération excessive des cellules gliales (Cytosine-B-arabino-furanoside 1.5 µM, F-Uridine 10 µM, Uridine, 10 µM, Sigma Aldrich). Finalement, 200 µl de la suspension cellulaire ont été ajoutés par puits d'une plaque 96 puits noire à fond transparent (Greiner Bio-One, 655090) et les neurones ont été cultivés pendant 24 heures à 37°C et 5% CO₂.

Analyse de la signalisation calcique par imagerie sur les neurones sensitifs murins

Les neurones en culture ont été lavés avec 100 µl de HBSS et incubés pendant 30 min à 37°C, puis 30 min à température ambiante avec 100 µl de sonde Fluo-8-AM (Screen Quest™)

Fluo8 calcium AAT bioquest®) préparée selon les recommandations du fabricant. Après marquage, la solution de sonde fluo—8 a été retirée et remplacée par 100 µl de HBSS.

La signalisation calcique des neurones en réponse à différents agonistes a été suivie par imagerie en fluorescence grâce à un microscope champ large Apotome 2 (Zeiss) équipé d'un objectif 10x et d'une caméra (excitation : 460-490 nm d'émission, émission : 515 nm). La séquence d'acquisition de la fluorescence (une image par seconde) est composée de trois phases : 1) la fluorescence basale des cellules est mesurée pendant 5 secondes, 2) la réponse calcique est suivie pendant 60 secondes après traitement des cellules par ajout de solutions de chymotrypsine ou de thrombine (concentrations indiquées sur les graphiques), 3) la réponse des cellules après ajout de chlorure de potassium KCl à 50 mM final est mesurée pendant 30 secondes pour discriminer les neurones des cellules gliales, qui ne répondent pas à cette concentration de KCl.

L'analyse des réponses calciques a été réalisée en cellule unique grâce au logiciel ImageJ. Chaque cellule a été segmentée et sa valeur de fluorescence moyenne mesurée à chaque seconde. Le pourcentage de neurones répondant au traitement d'intérêt a été calculé pour chaque puits. L'amplitude moyenne de cette réponse a aussi été calculée via l'analyse de la valeur de la fluorescence maximale obtenue après traitement, normalisée par rapport à la fluorescence basale des neurones (Fmax).

Echantillons humains

Tous les échantillons biologiques humains ont été obtenus à partir de patients suivis au CHU de Toulouse, ayant donné leur consentement éclairé avant inclusion dans l'étude. La collection de ces échantillons a reçu l'approbation du comité d'éthique dans le cadre des protocoles « COLIC » DC-2015-2443, « BACAP » NCT02818829, « NCT05251415 ».

Les tissus intestinaux utilisés provenaient (1) de zones saines distantes des zones lésées, prélevées sur des patients atteints de cancers intestinaux ou (2) de tissus issus de zones saines ou inflammatoires, prélevés sur des patients atteints de MICI. Du tissu macroscopiquement sain d'estomac fundique humain a été obtenu dans le cadre d'une chirurgie bariatrique de type « Sleeve gastrectomie ». Un échantillon de pancréas humain

prélevé sur une zone macroscopiquement saine et distante de la zone lésée a été obtenu dans le cadre d'une procédure de Whipple pratiquée chez un patient atteint d'un adénocarcinome pancréatique.

Préparation des échantillons humains

Dès réception, les résections d'estomac, et d'intestins ont été ouvertes afin d'accéder à la muqueuse, lavées avec du PBS (Sigma-Aldrich), et des échantillons englobant l'épaisseur totale du tissu ou uniquement le compartiment muqueux ont été prélevés. Une partie des explants a été reprise dans 1 mL de TRI Reagent® pour extraire les ARN totaux. Une autre partie a été congelée à sec et conservée à -80°C pour des analyses protéiques ultérieures.

La résection de pancréas humain a été préparée comme décrit dans le matériel et méthodes de la publication *Guignard et al.* (Partie 1 des résultats).

Des échantillons de tissus pancréatiques et d'estomac ont été fixés (4% de formol pendant 24h), puis transférés en éthanol jusqu'à inclusion en paraffine afin de procéder à des analyses histologiques et immunohistochimiques.

Isolement des cryptes et culture des organoïdes humains

Les tissus utilisés provenaient de résections coliques macroscopiquement saines et prélevées à distance des zones lésées chez des patients atteints de cancer colorectal.

Pour chaque résection, les tissus ont été ouverts longitudinalement afin d'accéder à la muqueuse et lavés dans du PBS. La muqueuse a été disséquée en fines bandelettes d'environ 2 cm et placée quatre fois 5 minutes dans un bain d'antibiotiques et d'antifongiques contenant 50 µg/mL de Gentamicine (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL de Normocine (Invivogen) et 0,25 µg/mL de Fungizone (Gibco). Les bandelettes ont été recoupées en morceaux d'environ 5 mm et incubées dans une solution de DTT (dithiothreitol, Roche) à 10 mM à température ambiante, puis 1 heure à 4°C dans une solution d'EDTA à 8 mM (acide éthylènediaminetétraacétique, Ambion) sous agitation, afin de fragiliser l'adhérence des cellules épithéliales. Les cryptes coliques ont été décollées du tissu par agitation manuelle dans 10 mL de PBS. Le surnageant obtenu a été centrifugé pendant 2 min à 40 g et le culot contenant les cryptes a été repris

dans 10 mL de milieu de DMEM/F12 (Invitrogen, 12634-010) supplémenté avec de 200 mM de Glutamax (Invitrogen, A1286001), 10 mM d’HEPES (Gibco, 5630-056) et 5 % de Sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), puis centrifugé à nouveau pendant 2 min à 40 g. Cette étape a été répétée deux fois supplémentaires. Les cryptes isolées ont été quantifiées puis re-suspendues dans du Matrigel© (Corning, 354277). 50 cryptes contenues dans 25 µL de Matrigel© ont étéensemencées par puits d’une plaque 48 puits (Greiner) et cultivées pour former des organoïdes. Les cryptesensemencées et les organoïdes en découlant ont été cultivés dans 250 µL de milieu dit « WENR », dont la composition exacte est détaillée dans le Tableau 5. Le facteur Wnt-3a a été apporté par du milieu conditionné issu de cultures de fibroblastes produisant ce facteur (ATCC® CRL-2647™). Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours et les cultures ont été maintenues en incubateur à 37°C sous 5% de CO₂ pendant dix jours. Le temps nécessaire à la formation d’organoïdes à partir de cryptes isolées varie de deux à quatre jours.

Tableau 5: Composition du milieu de culture des organoïdes

Réactif	Fournisseur	Référence	Concentration finale
Adcanced DMEM/F12	Invitrogen	12634-010	48% (v/v)
HEPES	Gibco	15630-056	10 mM
Glutamax	Invitrogen	A1286001	200 mM
Milieu conditionné WNT3A			48% (v/v)
N2	Invitrogen	17502-048	1% (v/v)
human R-Spondine 1	R&D	4645RS	1 µg/mL
Nicotinamide	Sigma	N0636	10mM
B27 (sans Vitamine A)	Life tech	12587-010	2% (v/v)
human Noggin	Tebu	120-10C	100 ng/mL
human EGF	Gibco	PHG0314	50 ng/mL
SB202190	Sigma	57067	10 mM
Gastrine	Sigma	G9145	10nM
PGE2	Sigma	P0409	0,01mM
N_acetylcyteine	Sigma	A9165-5G	1 mM (uniquement entre J0 et J2)
LY2157299	Axon MedChem	1941	0,5 µM (uniquement entre J0 et J2)
Y27632	Sigma	Y0503	10 µM (uniquement entre J0 et J2)

Traitements chroniques des organoïdes à la chymotrypsine et antagoniste de PAR2

A partir du quatrième jour de culture, de la chymotrypsine pancréatique bovine (Sigma Aldrich, C3142) à 0,05 ou 0,5 U/mL a été ajoutée au milieu de culture des organoïdes.

Le tampon de dissolution de la chymotrypsine a été utilisé comme témoin (HBSS). Le traitement a été renouvelé tous les deux jours jusqu'au dixième jour de culture. Pour certaines expériences, un antagoniste de PAR2, le I-191 à 10 μM (Axon Medchem, 3043) ou son diluant (DMSO à 0,05%), ont été ajoutés au milieu de culture 45 min avant le traitement à la chymotrypsine. Les organoïdes ont été récoltés et lysés au dixième jour de culture. Brièvement, le milieu de culture a été retiré et le matrigel solubilisé après ajout de 250 μL d'une solution de PBS froide (4°C) contenant 5 mM d'EDTA. Les organoïdes en suspension ont été centrifugés pendant 3 minutes à 400g et le culot obtenu a été repris dans 1 mL de TRI Reagent®.

Analyse morphologique des organoïdes par microscopie « High-Content Screening » (HCS)

Le suivi morphologique des organoïdes a été réalisé à chaque jour de traitement à l'aide du microscope de criblage à haut contenu Opera Phenix® (PerkinElmer). Ce système combine un microscope champs large et confocal automatisé, couplé au logiciel de commande et d'analyse d'images Harmony®. Il permet de paramétrer un protocole d'acquisition d'images qui sera appliqué automatiquement à l'ensemble des cultures à analyser. Les organoïdes ont été imagés à faible grossissement (5X), en utilisant le module champ large à transmission afin de visualiser la totalité de la surface des puits. Les organoïdes sont des structures en trois dimensions enrobées dans une matrice extracellulaire de type matrigel. Par conséquent, un plan situé à 400 μm du fond de la plaque de culture a été sélectionné pour les analyses d'images. Il permettait d'obtenir un plan médian de la plupart des organoïdes contenus dans le dôme de matrigel (Figure 36).

L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Harmony®. Afin de mieux délimiter les organoïdes, les images ont été transformées par une analyse de texture de type « SER Edge ». Un bloc de détection a ensuite permis de segmenter les organoïdes et les signaux aspécifiques (débris, impuretés, organoïdes mal délimités) ont été éliminés par exclusion des objets de surface inférieure à 16 000 μm^2 . Le nombre, la surface et la circularité des objets retenus, correspondant aux organoïdes, ont alors été calculés.

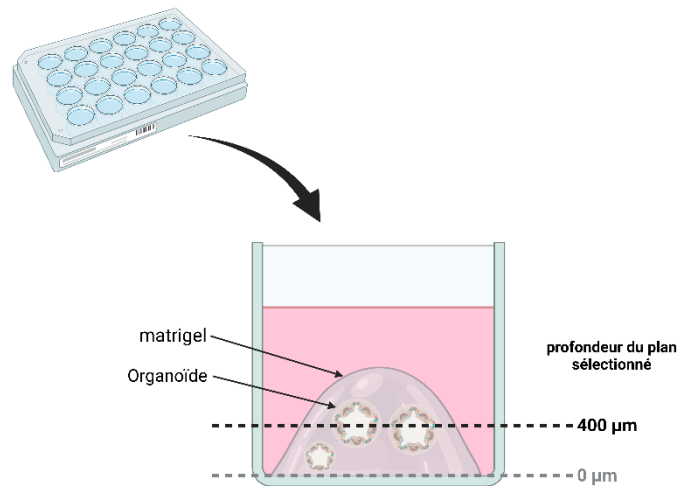


Figure 36: représentation schématique du plan sélectionné pour l'analyse du suivi morphologique des organoïdes.

Clonage, transfection des cellules CHO et KNRK et tests de clivage

Des récepteurs modifiés avec une nanoluciférase (nLUC) insérée à l'extrémité N-terminale de la séquence humaine de PAR3 ou PAR4 ont été générés pour analyser le clivage extracellulaire des PAR. Brièvement, des sites de restriction ont été ajoutés par mutagenèse dirigée dans un vecteur pCDNA3.1-hPAR3 au niveau de la séquence de l'extrémité N-terminale de PAR3, permettant l'insertion d'un produit de PCR codant une nanoluciférase en amont de l'ADNc de PAR3. Le vecteur résultant a été nommé pcDNA-nLuc-PAR3. Pour PAR4, une construction similaire a été générée en utilisant cette stratégie.

La transfection des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et KNRK (Kirsten murine sarcoma virus transformed Rat Kidney epithelial cells), leur sélection, leur culture et les tests de clivage ont ensuite été réalisés comme décrit dans la publication Guignard *et al.* (Voir section Résultats, partie 1).

Culture de lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires utilisées ont été cultivées en flasques de 25 cm² et maintenues à 37°C et 5 % de CO₂. Le milieu a été changé tous les deux jours et les cellules ont été trypsinisées puis diluées dans une nouvelle flasque lorsque le tapis cellulaire atteignait 90

% de confluence. La lignée épithéliale colique d'origine murine CMT93 (ATCC-CCL-223) a été cultivée dans du milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec 100 U/mL de pénicilline/streptomycine, 10% de SVF et 1% de NEAA (Gibco). La lignée épithéliale murine d'intestin grêle mICcl2 établie par Bens *et al.* 1996 [391] a été cultivée dans le milieu détaillé en Tableau 6.

Tableau 6: composition du milieu utilisé pour la culture des cellules mICcl2.

Réactif	Fournisseur	Référence	Concentration finale
mEGF	Calbiochem	324851	10 ng/mL
Insuline	Sigma-Aldrich	I-0516	5 mg/mL
Sélénite de sodium	Sigma-Aldrich	S-5261	60 nM
Apo-Transferrine humaine	Sigma-Aldrich	T-1147	5 µg/mL
Hormone T3	Gibco	15630-056	1 nM
Hepes	Calbiochem	642515	20 mM
SVF	Sigma-Aldrich	F7524	0,02
L-Alanyl-L-Glutamine	Gibco	35050061	1 mM
Pénicilline/streptomycine	Sigma-Aldrich	15140122	40 U/ml
DMEM/F12	Invitrogen	12634-010	

Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR semi-quantitative ou quantitative

A partir d'échantillons conservés en TRI Reagent® (échantillons murins, humains, organoïdes, cellules en culture), les ARN totaux ont été extraits grâce au kit Direct-zol DNA/RNA Miniprep (Ozyme, R2080), en suivant les instructions du fabricant. La quantification des ARN et leur état de pureté ont été déterminés par mesure spectrophotométrique grâce à un Nanodrop (Implen GmbH). Une réaction de transcription inverse a été réalisée à partir de 0,5-3 µg d'ARN à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Maxima First Strand (ThermoScientific).

Pour les analyses PCR semi-quantitative, la réaction de PCR a été réalisée à partir de 15 ng d'ADNc en utilisant le kit RedExtract-N-Amp™ PCR Ready Mix (Sigma-Aldrich), incluant 625 nM d'amorce dans le mélange réactionnel. Le programme de PCR était composé de : 1) étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, 2) 30 cycles d'amplification incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 60°C pendant 30 secondes, et une élongation à 72°C pendant 30 secondes, 3) une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 minutes. Tous les amplicons ayant une longueur inférieure à 400 pb (paires de base)

ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 ou 2 % selon la taille du produit d'amplification attendu. Un marqueur de taille a aussi été déposé (100 bp DNA Ladder, Promega).

Pour les analyses de RT-PCR quantitative (RT-qPCR), 15 ng d'ADNc ont été mélangés à un mix contenant 600 nM d'amorces d'intérêt et 5 µL du mix enzymatique Takyon™ No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec). La réaction de PCR et la quantification de la fluorescence émise par l'amplification des transcrits ont été réalisées via un automate LightCycler® 480 (Roche), selon le programme suivant :

- Dénaturation initiale : 95°C - 5 minutes,
- Puis 45 cycles d'amplification : dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, hybridation à 60°C pendant 20 secondes et élongation à 72°C pendant 20 secondes.
- Courbe de fusion : 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 70°C, puis une acquisition de fluorescence continue jusqu'à la température de 97°C

L'expression relative des transcrits d'intérêt a été calculée par la méthode suivante :

1. Calcul du paramètre « $-\Delta Ct$ », défini comme : *le nombre de cycles pour le gène de ménage Hprt (Ct_{Hprt}) - nombre de cycles pour le gène cible (Ct_{cible}).*
2. Calcul de l'expression relative du gène cible dans les échantillons traités par rapport aux échantillons témoins : $\Delta\Delta Ct$ (gène cible) = $\Delta Ct(\text{condition traitée}) - \Delta Ct(\text{condition contrôle})$
3. Calcul du rapport d'expression du gène cible dans les échantillons traités par rapport aux échantillons témoins : $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

La séquence des amorces utilisées est listée en Tableau 7.

Tableau 7: séquences des amorces utilisées en PCR ou qPCR

Transcrit	Amorce sens (5' - 3')	Amorce anti-sens (5'-3')
<i>mHprt</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGACTGCTTAACCAG
<i>mF2r</i>	TCTTCCCGCGTCCCTATGA	GGGGTTCACCGTAGCATCTG
<i>mF2r1 (mPAR2)</i>	GGACCGAGAACCTTGAC	GAACCCCTTCCCAGTGATT
<i>mF2r12 (mPAR3)</i>	AGCTGAGGGGAATCTACGCT	AGGTTGGCTTTGCTGAGTTG
<i>mF2r13 (mPAR4)</i>	TGCGTAGACCCCTTCATC	GGGTTCAAGAGGGATGTAG
<i>CTRB1 (humaine)</i>	TGTCCAATGCCGAATGCAAG	GTTCCATGGGTTTACTGAGGC
<i>CTRC (humaine)</i>	GAGCTGAGTGACACCATCCA	ACCAGTCAATCCTGGAGCAC
<i>CTRL (humaine)</i>	CCCTAAGCCTGGTTCTCC	TGTGTAATGGCCCGAGAG
<i>HPRT (humaine)</i>	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA	CGAGCAAGACGTTCACTCT

<i>Ctrb1 (souris)</i>	TTGACGATGACTTCCTGCT	CCCAGGACTCCTTGCACTTA
<i>hHPRT</i>	TGGGAGGCCATCACATTGT	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA
<i>hGAPDH</i>	GAGAAGGCTGGGGCTCAT	TGCTGATGATCTTGAGGCTG
<i>hOCLN</i>	ACGCCGGTTCCTGAAGTG	AACGAGGCTGCCTGAAGTCAT
<i>hCLDN1</i>	GATGAGGATGGCTGTCAATTGG	CATACCATGCTGTGGCAACTAAA
<i>hCLDN2</i>	GCCACCCACAGACACTTGTAAAGGAG	AGCCCCAGAAGGCCTAGGAT
<i>hCLDN4</i>	ATGCAGTGCAAGGTGTACGA	GACACCGGCACTATCACCAT
<i>hTJP1(ZO1)</i>	AGAGAAAGGTGAAACACTGCTG	ATCACAGTGTGGTAAGCGCA
<i>hEGF</i>	CCGCATCTGGGGTCAATCAT	GTGCAGGACCCACACAAGTA
<i>hTFF3</i>	GCTCTGCTGAGGAGTACGTG	GGGATCCTGGAGTCAAAGCA
<i>hMUC2</i>	ACTCCAACATCTCCGTGTCC	AGCCACACTTGTCTGCAGTG
<i>hMYC</i>	TACCTCTCAACGACAGCAG	CCTGCCTCTTTCCACAGAAACAAC
<i>hKI67</i>	TGCAGCAAGCACTTGGGAGA	CTTGACACACACATTGTCCTCAG
<i>hLGR5</i>	ACGTGACCTGAAGATTTCTGCTTG	CAGAGGGGATCTGAAAAGTGTGAAGTC
<i>hEPHB2</i>	CCACTCATCATCGGCTCCTC	GCTCAAACCCCGTCTGTTA
<i>hTNFα</i>	ACTTTGGAGTGATCGGCC	GCTTGAGGGTTTGTACAAC
<i>hCXCL8 (IL8)</i>	GCCTTCTGATTTCTGCAGCT	TGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCAC
<i>hIL10</i>	TGAGGCTACGGCGCTGTC	CACTCATGGCTTTGTAGATGCC
<i>hIL16</i>	CTAAACAGATGAAGTGCTCCTTCC	CACATAAGCCTCGTTATCCC
<i>hIL18</i>	GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG	CCTTGATGTTATCAGGAGGATTC
<i>hF2R (PAR1)</i>	AAGAAAGTTCGGATCCAGC	TTTTAACCTCCAGCAGTCC
<i>hF2RL1 (PAR2)</i>	GCTAGCAGCCTCTCTCTCT	GTGGGATGTCCATCAACT
<i>hTP53</i>	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	TCTCGAACATCTCGAAGCG
<i>hTLR4</i>	CCGTTTTATCACGGAGGTGGT	GGGAGGTTGTCGGGGATTTT
<i>hSI</i>	CATCCTACCATGTCAAGAGCCAG	GCTTGTTAAGGTGGTCTGGTTAAATT
<i>hCHGA</i>	CCCCACTGTAGTGTGAACC	GGAGTGCTCCTGTTCTCCC
<i>hTGFB</i>	AAGGACCTCGGCTGGAAGTG	CCCGGTTATGCTGGTTGTA
<i>hPKCζ</i>	GCTTACATTTCTCATCCCG	ACTTTCATGGCGTAAATTTGG
<i>hATF4</i>	TGGCATGGTTTCCAGGTCTCT	CCAACAACAGCAAGGAGGATGC
<i>hATF6</i>	AGGGCAGAACTCCAGGTGCT	TGCACCCACTAAAGGCCAGAC
<i>hATG16L1</i>	TACCAGCTACTGCCTTGTGTGTC	TGAACTGCACAGCGTTGACTT
<i>hCDX2</i>	CAGCCAAGTGAAAACCAG	TTCTCTCCTTTGCTCTG
<i>hCD133</i>	TTTGGTGCAAATGTGGAAA	TTGAAGCTGTTCTGCAGGTG
<i>hFZD4</i>	AGCTGCAGTCTTCTTTGTTTC	GGTTGTGGTCTTCTGTGGT
<i>hATP12A</i>	GCTTTCTGCCCGCACTCTCAT	AAGCCGTGTAGCCGTCATTCC
<i>hSLC26A3</i>	AGACAAACTTCCAGTGCCAT	ACAGCCGTAGGATACACCTGC
<i>hASCL2</i>	TGAGCGCCCTCGACCTATGA	TCCAAGCCCGTTTCCACCG
<i>hLGR4</i>	TTGGGGGAATTTCTCAGGC	TGCACCACGAATGACTAGGG
<i>hMUC5AC</i>	TCCACCATATACCGCCACAGA	TGGACGGACAGTCACTGTCAAC
<i>hNEUROD1</i>	CAACAAAGGAAATCGAAACATGACC	GACACTCGTCTGTCCAGCTT
<i>hATOH1</i>	CCAGCTGCGCAATGTTATCC	TTGTAGCAGCTCGGACAAGG
<i>hALPI</i>	GAGCTCCATCTTCGGGTTGG	TCTCATTACGCTGTGGTCGC

Western-blot

Les tissus préalablement congelés à -80°C ont été broyés sur glace dans un tampon de lyse (Pierce IP Lysis Buffer, ThermoFisher Scientific), à l'aide d'une sonde d'homogénéisation (Benchmark D1000). Les broyats tissulaires obtenus ont été centrifugés à 2300g pendant 10 minutes à 4°C . Les surnageants ont ensuite été prélevés et la quantité de protéine totale a été dosée par méthode BCA (Thermo Scientific). Les échantillons ont été dilués dans du tampon LDS NuPAGE (Invitrogen) additionné de 5% de β -mercaptoéthanol et utilisés pour les analyses de Western-blot (WB). Une quantité égale de protéines (20 μg) a été déposée pour tous les échantillons dans les puits d'un gel de polyacrylamide Mini-PROTEAN[®] TGX[™] 4-15 % (Bio-rad), les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Après blocage dans du PBS contenant 0,2 % de Tween 20 et 5 % de lait, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps anti-CTRB1/2 (D-5, sc-393414, Santa Cruz) dilué au 1/500 dans le tampon de blocage. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois 5 minutes avec une solution de PBS additionnée de Tween[™]20 à 0,2% et incubées pendant 1h avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase dilué au 1/10 000 (Jackson ImmunoResearch, 115-035-166). Le signal correspondant à la CTRB a été visualisé via l'activité de la peroxydase lors de l'ajout d'un tampon ECL (GE Healthcare), à l'aide d'un système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad). Des échantillons protéiques provenant de cultures cellulaires ont également été préparés et analysés pour la détection de la phosphorylation de ERK1/2 comme décrit dans la publication Guignard *et al.* (voir section résultats, partie 1).

Dosage d'activité chymotrypsique fécale

Des selles humaines ont été obtenues à partir de donneurs sains ou de patients atteints de MICI. A réception, 30 mg d'échantillon fécal ont été pesés puis placés dans des tubes contenant des billes de céramique (6913500, MP Biomedicals) et 1,5 ml de tampon de dosage d'activité protéolytique (100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM CaCl_2 , 1 mM CHAPS). Les échantillons ont ensuite été homogénéisés pendant 2x30 secondes à 5000 tr/min avec un homogénéisateur de tissus Precellys, puis clarifiés par centrifugation (10 min - 2300 g à 4°C).

L'activité de type chymotypsique présente dans ces échantillons a été mesurée en suivant le clivage d'un substrat peptidique chromogène spécifique de ce type d'activité : Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AminoMéthyl Coumarine (AMC, Bachem, 4012873). Pour l'ensemble des tests, 50 µL d'extraits ont été placés dans les puits de plaques 96 puits noires à fond transparent (Greiner Bio-One, 655090) et pré-incubés pendant 20 min à 37°C. Le suivi de la réaction enzymatique a démarré par ajout de 50 µL de la solution de substrat à 1 mM (dilué dans Tris-HCl 100 mM pH8, CaCl₂ 1 mM) aux échantillons. Le clivage du substrat, conduisant à la libération d'AMC libre, a été suivi en mesurant la fluorescence (excitation : 360 nm, émission : 460 nm) toutes les 30 secondes pendant 20 minutes à l'aide d'un lecteur de plaques Varioskan Flash (ThermoFisher Scientific). Les vitesses initiales des courbes de fluorescence ont été déterminées à l'aide du logiciel SkanIt™ (ThermoFisher Scientific) et exprimées en Unité Relative de Fluorescence (RFU) par minute. La présence d'une activité spécifique de type chymotrypsine dans les échantillons a été confirmée par comparaison avec les valeurs obtenues en présence de l'inhibiteur sélectif chymostatine à 500 µM (Sigma-Aldrich, C7268). La vitesse initiale obtenue en présence de cet inhibiteur a été soustraite à celle obtenue en son absence afin de considérer uniquement le signal émis par les enzymes « chymotrypsine-like ». L'activité protéolytique a été quantifiée en RFU rapportée à la concentration en protéines totales de chaque échantillon, ayant été mesurée par méthode BCA.

Immunohistochimie

Après fixation et inclusion en paraffine, les tissus d'intérêts ont été coupés à une épaisseur de 5 µm à l'aide d'un microtome (Leica). Les coupes obtenues ont été déposées sur des lames de microscopie en verre. Ces tissus ont été déparaffinés par chauffage pendant 10 minutes à 65°C, suivis de deux bains successifs de xylène (5 minutes), puis déshydratés par deux bains successifs d'éthanol à 100% avant d'être lavés à l'eau pendant 5 minutes. Les sites antigéniques ont ensuite été démasqués par chauffage à 100°C pendant 20 minutes dans un bain de Citrate de sodium à pH 6.

Une fois ces étapes passées, les coupes de tissus ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution de saturation et de perméabilisation composée de PBS additionné de 1% de d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich) et 0,5% de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich). Les

lames ont ensuite été incubées toute une nuit à 4°C avec un anticorps primaire de souris anti-CTRB1/2 (D-5, sc-393414, Santa Cruz) dilué au 1/200 dans le tampon de saturation. Pour certaines expériences un anticorps de lapin anti-E-cadhérine (3195S, Cell Signaling Technology) au 1/400 ou un anticorps de lapin anti-pepsinogène II (ab255826, Abcam) au 1/500 ont été utilisés en combinaison avec l'anticorps anti-CTRB1/2. Après cette incubation, l'excès d'anticorps primaire non fixé a été lavé à trois reprises avec une solution de lavage constituée de PBS et de Tween™20 à 0,01% (Thermo Scientific™). Les tissus ont alors été incubés pendant 1h avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire ciblé et dilué au 1/1000 en tampon de saturation, parmi lesquels : âne anti-souris A568 (A-10037, Invitrogen), âne anti-souris A488 (715-545-150, Jackson Immuno Research), âne anti-lapin A488 (A 21206, Invitrogen), âne anti-lapin A555 (A-31572, Invitrogen).

Par la suite, les lames ont été rincées à trois reprises avec la solution de lavage. Les tissus ont été placés entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), afin de marquer les noyaux (ProLong™ Gold P36931, Invitrogen). Toutes les acquisitions présentées ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM-710.

Analyses statistiques

Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software). Pour les comparaisons simples, les différences statistiques ont été évaluées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. Pour les comparaisons multiples, le test de Friedman a été utilisé, suivi du test de Dunn. Pour les expériences de signalisation calcique sur les neurones sensitifs, différentes concentrations de chymotrypsine ont été testées indépendamment pour des raisons techniques, ainsi un test de Kruskal-Wallis a été utilisé suivi du post-test de Dunn. Concernant les analyses des organoïdes, pour les histogrammes, les valeurs sont représentées en moyenne \pm SD. Les corrélations entre l'activité chymotrypsique fécale et les paramètres cliniques des patients ont été évaluées par le test de corrélation des rangs de Spearman. Dans tous les cas, le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats expérimentaux

Partie 1 : Étude pharmacologique de l'interaction entre la chymotrypsine et les récepteurs PARs

Préambule

Les récepteurs PARs sont des régulateurs majeurs de l'homéostasie intestinale. Ces récepteurs sont atypiques puisque leur activation est déclenchée par clivage protéolytique de sites spécifiques au sein de leur domaine extracellulaire. Cependant, le clivage d'un PAR au niveau de sites non canoniques peut aussi conduire à une activation partielle de sa signalisation, voir à son désarmage total.

Dans l'intestin, ces récepteurs sont exprimés par une grande variété cellulaire, incluant les cellules épithéliales, et régulent des fonctions pléiotropes (perméabilité, motricité, transport ionique...). Une meilleure caractérisation des acteurs régulant la signalisation des PARs est donc un enjeu majeur.

Dans cette première étude, nous avons cherché à déterminer si les récepteurs PARs présents à la surface des cellules épithéliales intestinales pouvaient être une cible pour la chymotrypsine pancréatique.

- **La première partie de ces résultats s'est intéressée à la capacité de la chymotrypsine à activer les récepteurs PAR1 et PAR2 à la surface des cellules épithéliales intestinales. Elle a fait l'objet d'une publication soumise au *British Journal of Pharmacology* et actuellement en cours de révision.**
- **La seconde partie de cette section présente des analyses complémentaires sur la pharmacologie des récepteurs PAR3 et PAR4.**

Chymotrypsin activity signals to intestinal epithelium by Protease-Activated Receptor-dependent mechanisms

Running title: Chymotrypsin signals through Protease-Activated Receptors

Simon Guignard¹, Mahmoud Saifeddine², Koichiro Mihara², Majid Motahhary², Magali Savignac³, Laura Guiraud¹, David Sagnat¹, Mireille Sebbag¹, Sokchea Khou¹, Corinne Rolland¹, Barbara Bournet⁴, Louis Buscail⁴, Etienne Buscail^{1,5}, Laurent Alric⁶, Caroline Camare^{7,8}, Mouna Ambli¹, Nathalie Vergnolle^{1,2,5}, Morley D. Hollenberg², Céline Deraison¹ and Chrystelle Bonnard¹

¹IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, Univ Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

²Departments of Physiology & Pharmacology, and Medicine, University of Calgary Cumming School of Medicine, 3330 Hospital Drive NW, Calgary, Ab T2N 4N1, Canada.

³Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity) INSERM UMR1291 - Centre National de la Recherche Scientifique UMR5051, University Paul Sabatier Toulouse III, F-31024 Toulouse, France

⁴Gastroenterology department Toulouse university Hospital

⁵Digestive surgery department Toulouse university Hospital

⁶Toulouse University Department of Internal Medicine and Digestive Diseases, Rangueil, Toulouse 3 University Hospital, Toulouse, France.

⁷Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

⁸University of Toulouse, UMR1297, Inserm/Paul Sabatier University, Toulouse, France

§Address for correspondence:

Dr Nathalie Vergnolle,
Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD)
INSERM UMR-1220
Purpan Hospital, CS60039,
31024 Toulouse cedex 03 France
Phone : +33 5 62 74 45 00
E-mail : nathalie.vergnolle@inserm.fr

Data availability statement

The data supporting the findings of this study are available upon request from the corresponding author.

Funding statement

The doctoral salary of S.G was supported by Medical Research Foundation to NV (FRM - FDT202204014931) and National Research Institute for agriculture, feed and environment (INRAE) to CB. This study was supported by Paul Sabatier University, a grant of the European Research Council (ERC- 310973 PIPE) to NV, the ANR project TITAN (ANR-18-CE18-0019), the ANR project PARCURE (ANR-20-CE18-0024) and a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to MDH.

Author contribution statement

S.G., M.Sai., K.M., M.M., S.K., L.G., M.SeB., C.R. and M.A. performed experiments and analyses of the data. C.B., N.V. and M.D.H. contributed to the overall design of this study and data analysis. C.B., S.G., M.D.H., N.V., C.D., M.SeB., and M. Sav. contributed to the discussion and experimental design. L.B, E.B., B.B., L.A., C.C., C.D. and N.V. contributed to the acquisition of human material. C.B. and S.G. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Acknowledgments

Acknowledgements are due to the members of the animal housing facilities US006 (Toulouse): M. Lulka, T. Bernal, and R. Balouzat. We are grateful to Fabrice Pierre from UMR1331 Toxalim INRAE for providing CMT93 cells. The authors also acknowledge the U1220-IRSD Organoids Core facility for assistance in the collection of human mucus samples. We are grateful to members of NV-CD team for help and discussions.

Conflict of interest disclosure

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests related to the work presented here.

Bullet point summary

What is already known?

- Chymotrypsin is a pancreatic serine protease of which the primary function is to break down food proteins in the gut lumen.
- PAR1 and PAR2 are protease-activated receptors expressed by intestinal epithelial cells at the apical and basal surfaces.

What this study adds

- Chymotrypsin is present and active in the close vicinity of the colonic epithelium and signals to epithelial cells.
- Chymotrypsin activates calcium and ERK1/2 signals downstream of PAR2 and disarms PAR1 from further activation by thrombin in intestinal epithelial cells.

Clinical significance

- The discovery of this novel signaling function for chymotrypsin opens new therapeutic avenues for pathologies involving PAR1 and PAR2.
- The very efficient PAR1 disarming effect of chymotrypsin could have a major clinical impact in the control of platelet activation.

Abstract

Background and purpose

Chymotrypsin is a serine protease produced by the pancreas and secreted into the lumen of the small intestine, where it digests food proteins. Due to its presence in the gut lumen, we hypothesized that chymotrypsin activity may be found close to epithelial cells and signals to them *via* Protease-activated receptors (PARs). We deciphered molecular pharmacology mechanisms for chymotrypsin signaling in intestinal epithelial cells.

Experimental approaches

The presence and activity of chymotrypsin were evaluated by western blot (WB) and enzymatic activity tests in luminal and mucosal compartments of murine and human gut samples. The ability of chymotrypsin to cleave the extracellular domain of PAR1 or PAR2 was assessed using cell lines expressing N-terminally-tagged receptors. The cleavage site of chymotrypsin on PAR1 and PAR2 was determined by HPLC-MS analysis. To study the pharmacology of chymotrypsin signals, we investigated calcium signaling and ERK1/2 activation using calcium mobilization assays and WB in CMT93 intestinal epithelial cells.

Key results

We found that chymotrypsin was present and active in the vicinity of the murine and human colonic epithelium. Molecular pharmacology studies evidenced that chymotrypsin cleaved both PARs receptors. While chymotrypsin activated calcium and ERK1/2 signaling pathways through PAR2, it disarmed PAR1, preventing further activation by its canonical agonist thrombin.

CONCLUSION

Our work suggests that the function of chymotrypsin in the gut lumen goes well beyond a simple digestive role. Our results highlight the ability of chymotrypsin to signal to intestinal epithelial cells *via* PARs, which may have important physiological consequences in gut homeostasis.

Keywords: chymotrypsin, intestinal epithelium, PAR1, PAR2, calcium signaling, MAPK, disarming cleavage.

INTRODUCTION

The intestinal epithelium is constantly exposed to luminal material such as microbiota, its metabolites, diet residues and host secretion products, including the pancreatic juice. The latter component contains a large amount of proteases (trypsins, chymotrypsins and elastases) that have an essential role in the digestion of dietary proteins (Pandol 2010). Although historically considered only as degradative enzymes, proteases are now viewed as true signaling mediators thanks to their ability to interact with PARs (Protease-Activated Receptors). PARs are GPCRs whose activation regulates many physiological and pathophysiological processes particularly in the gut (Adams et al. 2011; Vergnolle 2005, 2016; Sebert et al. 2019; Peach et al. 2023; Caminero et al. 2019; Alexander et al. 2021)

Unlike other GPCRs, the ligands for PARs are located within the extracellular N-terminus of the receptors themselves and are hence called tethered ligands (TL). The proteolytic cleavage of PARs at defined canonical sites situated at the N-terminal side of the TL enables its binding to the second extracellular loop of the cleaved receptor (Ramachandran et al. 2012). This binding induces conformational changes in the receptor that trigger downstream intracellular signals. However, while some proteases activate PARs by this mechanism, others have the ability to hinder PAR activation by cleaving their extracellular part at sites located downstream of the TL. This disarming cleavage makes them unusable for further proteolytic activation (Mihara et al. 2013; Dulon et al. 2003; Holzhausen et al. 2006). Nevertheless, some cleavages that sever the TL sequence downstream from the receptor's canonical activation site can also cause distinct signaling, a phenomenon called biased signaling (Ramachandran et al. 2011; Hollenberg et al. 2014). Synthetic agonist peptides mimicking the TL can also directly activate either uncleaved or N-terminally cleaved receptors, representing useful tools to study the pharmacology of PARs. Once activated, PARs can mediate a broad diversity of intracellular signals depending on the TL sequence unmasked by the cleaving protease and the ability of the receptor to interact with distinct G α protein subtypes (Ramachandran et al. 2012). Depending on the G α protein(s) involved, distinct signaling pathways have been described downstream of PAR activation like Ca²⁺ mobilization, Mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphorylation, cAMP inhibition or Rho-

associated kinase activation (Adams et al. 2011; Ramachandran et al. 2016; Ramachandran et al. 2012).

Four versions of PARs (PAR1-4) have been described, which are widely expressed throughout the body. Literature reports that PAR1 and PAR2 are the two main PARs expressed by the gut epithelium. PAR2 is strongly detected in the GI tract of humans and rodents, including in the stomach, the small intestine and the colon (Nystedt et al. 1994; Nystedt, Emilsson, et al. 1995; Nystedt, Larsson, et al. 1995; Bohm et al. 1996; Kong et al. 1997). Among the numerous cell types expressing this receptor, a clear immunolabelling of the epithelial compartment was reported in human and murine colon samples, especially at the apical side (D'Andrea et al. 1998; Cenac et al. 2002; Cuffe et al. 2002; Nasri et al. 2016). Lau and colleagues reported the existence of distinct apical and basolateral membrane pools of PAR2 in Caco2-BBe cells and in the mouse ileum (Lau et al. 2011). Regarding PAR1, while Darmoul and colleagues first indicated that this receptor is rather confined to cancerous colonic tissues and tumor-derived cell lines (Darmoul et al. 2003), many other publications suggest an expression of functional PAR1 in non-transformed intestinal epithelial cells (IECs) (Reinhardt et al. 2012; Sebert et al. 2018; Buresi et al. 2001). Activation of PAR1 by thrombin, its canonical protease agonist, promotes chloride secretion in non-transformed SCBN epithelial cells (Buresi et al. 2001). Moreover, apical stimulation of these cells with PAR1 agonists has also been reported to promote apoptosis (Chin et al. 2003), showing a functional PAR1 pool at membranes facing the lumen. Finally, both PAR1 and PAR2 have been shown to induce effects *in vivo* when their agonists are administrated intrarectally, likely involving direct activation of apical pools of receptors (Chin et al. 2003; Cenac et al. 2002; Motta, Palese, et al. 2021; Nguyen et al. 2003).

Chymotrypsin is a major serine protease produced by the pancreas and secreted into the gut lumen. Its primary and essential function is to digest dietary proteins into small peptides that can next be absorbed throughout the body. It is well established that pancreatic chymotrypsin is activated in the duodenum, the intestinal segment where its proteolytic activity is highest (Borgstrom et al. 1957; Goldberg, Campbell, and Roy 1969). Chymotrypsin activity then progressively decrease along the small intestine, but is still elevated in the ileum. Of importance, active chymotrypsin has been detected at the surface of the small intestinal mucosa, highlighting a direct contact between this enzyme and the epithelial cells (Goldberg, Campbell, and Roy 1968). In addition, chymotrypsin activity is still detectable in human feces

and was proposed as a marker for pancreatic exocrine function (Smith et al. 1971; Remtulla, Durie, and Goldberg 1986). Due to the presence of a thick mucus layer in the large intestine, whether chymotrypsin activity might be found at the vicinity of the colonic epithelium is still an open question. As well, its action on PARs and its potential effects on the host intestinal epithelium have never been addressed before.

In this study, we report the presence of active chymotrypsin neighboring the colonic mucosal surface. In addition, we identified that chymotrypsin is able to cleave PAR2 and activate downstream calcium and ERK1/2 signaling pathways in CMT93 colonic epithelial cells. Conversely, our results show that chymotrypsin disarms PAR1, hereby preventing further activation of the receptor by its canonical agonist thrombin. These results shed new light on the function of chymotrypsin in the gut, being able to regulate PAR-dependent signaling pathways.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

All reagents were prepared according to the recommendations of the manufacturer. Chymotrypsin purified from bovine pancreas and treated with N α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, a trypsin inhibitor) was prepared as stock solution at 1000 U/mL in 1mM HCl – 2mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, c3142). For some experiments, inactivated-chymotrypsin was prepared by heating for 1 hour at 95°C. Trypsin purified from bovine pancreas and devoid of chymotrypsin activity by TPCK treatment (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) (T1426), human plasma thrombin (T6884), the chymotrypsin inhibitor chymostatin (C7268), the cysteine protease inhibitor E-64 (E3132), the trypsin-like inhibitor TLCK (T7254), the aspartic protease inhibitor pepstatin A (P5318) and the serine protease inhibitor AEBSF (A8456) were all purchased from Sigma-Aldrich. The elastase inhibitor Elastatinal (sc-201272) was from Santa Cruz Biotechnology. The fluorogenic chymotrypsin substrate, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (aminomethyl coumarin) was provided by Bachem (4012873).

The C-terminally amidated PAR1 agonist peptide TFLLR-NH₂ and PAR2 agonist peptide SLIGRL-NH₂ were ordered from the GenScript company (20354 and RP19975 respectively). The PAR2 agonist peptide, 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ (2fLI) and the PAR1 and PAR2 N-terminal peptides used for chymolytic cleavage experiments (NATLDPRSFLLRNPNDKYE-NH₂ and TNRSSKGRSLIGKVDGTSHTVGKGV-NH₂, respectively) were prepared by the peptide synthesis facility of the University of Calgary, Canada (>95% purity by HPLC). The PAR1 antagonist, F16357, was from Pierre Fabre Medicaments (Toulouse, France). The PAR2 antagonist I-191 was purchased from Axon Medchem (3043). BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)), a Calcium chelator was purchased at AbCam (ab120503). BTP2 (N-{4-[3,5-bis(Trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl}-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide) was from Merck Millipore (203890), EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) was purchased at Sigma-Aldrich (E3889). The following antagonists were used for signaling experiments: YM-254890 (G α q antagonist,

AdipoGen Life Sciences, AG-CN2-0509), Pertussis toxin (PTX) (Gαi antagonist, Sigma-Aldrich, 516560) and Y-27632 (Rho-dependent Gα12/13 antagonist, Sigma-Aldrich, Y0503).

Human samples

All human biological samples were obtained from informed consenting patients treated at Toulouse Hospital (Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse) after receiving ethics committee approval under protocol numbers CAPITOL RC31/21/038, COLIC DC-2015-2443, NCT05251415 and BACAP NCT02818829 (Canivet et al. 2018) approved by the relevant Comité de Protection des Personnes (CPP Sud-Ouest et Outre-Mer I et II).

Human colonic mucus was obtained from macroscopically healthy zones, taken during surgical resections in patients with colorectal cancer or inflammatory bowel diseases. Upon reception, tissues were mechanically cleaned of any residual fecal material and the surface of the mucosa was gently scraped using a cell scraper to harvest the mucus. The viscous material obtained was homogenized for 30 seconds using a Benchmark D1000 homogenizer, in a buffer containing 100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM CaCl₂, 1mM CHAPS. The obtained mucus extract was then clarified by centrifugation (10 min – 2300 g at 4°C) and tested for the presence of chymotrypsin by proteolytic assays and Western-blot (WB) analyses.

Human colonic mucosal biopsies were obtained during colonoscopies in patients undergoing colorectal cancer screening. The tissue was placed in 300 µL of the buffer described above and homogenized in tubes containing ceramic beads (6913500, MP Biomedicals) using a 3D bead-beating tissue homogenizer (Precellys, Bertin technologies) for 20 seconds at 6800 RPM and then centrifuged for 10 min at 2300 g. The obtained extract was then evaluated in WB to assess the presence of chymotrypsin.

Human stools were obtained from healthy donors and, upon receipt, divided into 2 differentially processed portions. Regarding batches dedicated to WB analysis, 30 mg were placed in 1.5 mL of Phosphate-Buffered Saline (PBS) supplemented with 0.01 % NP-40 lysis buffer, 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 12 mM deoxycholic acid and a protease inhibitor cocktail (Roche, 11836170001), then homogenized in tubes containing ceramic beads using a 3D bead-beating tissue homogenizer for 2x30 seconds at 5000 RPM and then centrifuged for 10 min at 1000 g. The resulting supernatants were mixed with Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 0,01 mg/ml bromophenol blue, 5 % β-mercaptoethanol)

after protein quantification by the BCA (Bicinchoninic acid Assay) method. For the assay of proteolytic activity, 30 mg of fecal samples were also placed in tubes containing ceramic beads and 1.5 ml of protease activity assay buffer (100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM CaCl₂, 1 mM CHAPS). Samples were then homogenized for 2x30 seconds at 5000 RPM with a Precellys tissue homogenizer, and finally clarified by centrifugation (10 min – 2300 g at 4°C).

Human pancreatic tissue was obtained from a surgical resection during Whipple procedure. The tissue was homogenized in TRI Reagent® (TR 118, Molecular Research Center) using a Benchmark D1000 homogenizer. After addition of 200 µL chloroform, centrifugation at 12000 g for 15 min at 4°C and removal of the aqueous phase, protein precipitation was performed on the remaining organic phase by mixing it with 1 volume of isopropanol. After centrifugation at 2000 g for 20 min at 4°C, the protein pellet was washed twice with 50 % ethanol and resuspended in 2% SDS.

Mouse samples

All animal experiments were conducted in compliance with the European legislation on animal research and with ARRIVE 2.0 guidelines. C57BL/6J mice were used in this study. They were initially purchased from Janvier Laboratory (France) and bred at the US006/INSERM animal facility (Toulouse) in ventilated cages (5 mice maximum/cage) in a specific pathogen-free area. They had free access to food and water and were maintained in a 12-hour light/dark cycles. They were moved and acclimated to the local animal facility at least 1 week before sacrifice at 7 to 12 weeks of age. This was done by cervical dislocation after collection of fresh feces which were immediately frozen in liquid nitrogen. From these fecal samples, native protein extracts were prepared as follows and used for WB and proteolytic assay. Frozen murine stools were homogenized twice in 1.5 mL of RIPA buffer (1% NP40, 0,5% deoxycholic acid, 0,1% SDS) during 30 seconds at 4500 RPM using a Precellys tissue homogenizer followed by removal of insoluble material by a 10-min centrifugation at 2300 g and 4°C.

Murine pancreas was resected and prepared as described for human pancreas. Lung protein extracts were prepared by homogenization in lysis buffer (Pierce IP Lysis Buffer, ThermoFisher Scientific) using the 3D bead-beating tissue homogenizer for 2x30s at 6800 RPM, followed by removal of solid residual material by centrifugation at 13000 g for 5 min at 4°C.

The colon was resected and mucosal scrapings were performed using different strategies. In order to preserve the mucosa-associated material for proteolytic activity and WB assays, the colon was opened longitudinally, the residual fecal material was mechanically removed and mucosa was scraped using a microscopy slide. In contrast, for some WB experiments, the luminal surface of the colon was previously washed with 15 mL of PBS before opening, in order to remove any mucosa-associated material and retain only the host mucosal cells. This washed mucosa was then scrapped as described above. All mucosal scrapings were then homogenized for 2x15 seconds at 4500 RPM using a Precellys tissue homogenizer in lysis buffer supplemented with a cocktail of protease inhibitors (100 μ M E-64, 100 μ M pepstatin, 135 μ M TLCK and 100 μ M elastatinal) targeting a wide spectrum of protease activities except those belonging to the chymotrypsin family. All samples were then cleared of residual solid particles by centrifugation (13000 g – 5 min – 4°C) before analyses.

Preparation of PAR2-null HEK293 and CMT93 cells

PAR2^{-/-} Human Embryonic Kidney cells (HEK293) were derived from the HEK293 cell line constitutively expressing functional PAR1 and PAR2 (Kawabata et al. 1999), using a CRISPR approach similar to that described for the generation of PAR1^{-/-} HEK293 cells in Mihara *et al.* (Mihara et al. 2016). The three target sequences for CRISPR knockout of PAR2 were derived from the human PAR2/F2RL1 genomic sequence. [HGLibA_15864: GTCTGCTTCACGACATACAA, HGLibA_15865: GGAACCAGTAGATCCTCTAA, HGLibA_15866: CCCCAGCAGCCACGCCGCGC]. Cells were transfected with Lipofectamine LTX (ThermoFisher Scientific) and maintained in the presence of 5 μ g/ml puromycin to select knockout cells.

Murine colonic epithelial CMT93 cells deficient for PAR2 (PAR2^{-/-}) were generated using Crispr/Cas9 technology as described in Nasri *et al.* (Nasri et al. 2016). Briefly, CMT93 cells were electroporated with mPAR2 Crispr/Cas9 plasmid (sc420265, Santa Cruz Biotechnology). Transfected cells were sorted by flow cytometry to isolate GFP-positive cells from which clones were isolated and amplified.

Both HEK and CMT93 PAR2^{-/-} cells were validated by checking loss of calcium mobilization effect in an assay using PAR2 agonist peptides (Supp. Figure S1A, B).

Cloning and transfection of CHO cells

Engineered receptors with a nanoLuciferase (nLuc) inserted at the N-terminus of human PAR1 or PAR2 were created to monitor the extracellular cleavage of PAR molecules. These receptors also contained an eYFP inserted at the C-terminus of PAR1 or PAR2. The details of the construction strategy are as follows.

The pcDNA3.1-hPAR1 and pcDNA3.1-hPAR2 were obtained from cDNA Recourse Center (Bloomsburg, PA). The nLuc containing vector (pNL1.1) was a gift from Promega (Madison WI). The stop codon of hPAR1 in pcDNA3.1 was replaced by a tyrosine-encoding codon by site-directed mutagenesis and the coding sequence of eYFP (flanked by XhoI and XbaI restriction sites) was cloned downstream and in frame of the PAR1 sequence, giving a pcDNA- PAR1-eYFP vector. Restriction sites of BspEI and BamHI were then added by site directed mutagenesis at S31 of PAR1 allowing insertion of a nanoLuciferase PCR fragment upstream of the PAR1-eYFP cDNA. The resulting vector was named pcDNA-nLuc-PAR1-eYFP. For PAR2, similar constructs were generated using this strategy (nLuc inserted at Q27 site of hPAR2). CHO-K1 cells were transfected with the nLuc-hPAR1/2-eYFP pcDNA plasmids using the GeneJuice® transfection reagent kit (Sigma-Aldrich, 70967), according to the manufacturer's instructions. The transfected cells were selected with G418 at 1.5 mg/ml (Sigma-Aldrich, A1720) during one week.

For other experiments, site-directed mutagenesis was performed on the pcDNA3.1-hPAR2 to create a R³⁶/G mutant of hPAR2, using the QuikChange Lightning Multi Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Mississauga, ON). This plasmid was transfected in double deficient PAR1^{-/-} and PAR2^{-/-} HEK cells.

Cell culture

All cell lines were maintained at 37°C and 5% CO₂ and medium was changed every two days. Cells were subcultured when they reached 90% confluence.

CMT93 cells (ATCC-CCL-223) were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS) and 1% Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA). PAR2^{-/-} CMT93 cells were grown in a similar medium supplemented with G418 0.7 mg/mL.

CHO cells stably transfected with nLuc-PAR1/2-YFP were cultured in Ham-F12 (Gibco) supplemented with 10% FCS, 1% NEAA, in the presence of G418 at 0.7 mg/mL.

All HEK293 cells (wild-type (WT) and mutant), were routinely maintained in DMEM supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 10% FCS, and 2.5 µg/ml of plasmocin (InvivoGen, San Diego, CA). Sub-culturing was performed without trypsin by cell dissociation using enzyme-free buffer (PBS pH7.4, containing 1 mM EDTA). The CRISPR-derived PAR2^{-/-} HEK cells were maintained in regular medium containing 5 µg/ml puromycin to preserve their knockout status.

Determination of PAR1 and PAR2 cleavage sites by chymotrypsin

Peptides corresponding to a region of the N-terminal extracellular domain of human PAR1 and PAR2 containing the TL sequence were produced at the Faculty of Peptide Synthesis at the University of Calgary. hPAR1: NATLDPRSFLLRNPNDKYE; hPAR2: N-acetyl-GTNRSSKGRSLIGKVDGTSHVTGKGVT-amide; (TL activating sequences are underlined). Peptides (100 µM final) were incubated with chymotrypsin 5 U/ml for 30 min at 37 °C. Reactions were stopped by adding 1 volume of 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid in water. Samples were fractionated by reverse-phase HPLC, and eluted peptides were analysed by mass spectrometry as outlined previously (Oikonomopoulou et al. 2006).

Detection of ERK1/2 activation

WT or PAR2^{-/-} HEK293 cells were plated at 250 000 cells/well in 6-well plates in culture medium. The day after, cells were washed three times in PBS and maintained in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, 14025092) for 16h. Cells were then stimulated with different concentrations of chymotrypsin for 10 minutes. At the end of incubation, cells were placed on ice, washed once in PBS and lysed in the IP Lysis Buffer (ThermoFisher Scientific) supplemented with protease inhibitor (cOmplete™, Roche) and phosphatase inhibitor cocktail (P5726, Sigma-Aldrich). Some experiments were performed in the presence of antagonists: cells were incubated for 16h with PTX (100 ng/mL), 10 minutes with Y-27632 (10 µM) or 5 minutes with YM-254890 (10 µM) before stimulation by chymotrypsin. Protein lysates were centrifuged at 1000 g for 5 minutes at 4°C to eliminate insoluble material. These extracts were

diluted in LDS NuPAGE buffer (Invitrogen) supplemented with 5% β -mercaptoethanol and used for WB analysis.

Equal amounts of total proteins (5 μ g, according to BCA protein assay) were separated by SDS-PAGE on 4-15% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] precast gels (Bio-rad) and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking in PBS containing 0.2 % Tween 20 and 5 % milk, p42/p44 MAPK phosphorylation was detected using anti-phospho p42/p44 rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, #4370) diluted 1/2000 in blocking buffer and incubated overnight at 4°C. Bound anti-phospho p42/p44 were probed with HRP-conjugated anti-rabbit antibodies (Promega, W401B) diluted 1/3000 in blocking buffer. Peroxidase activity was visualized upon addition of ECL western blotting reagents (GE Healthcare) using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). The membranes were stripped during 20 minutes using a buffer containing 1% SDS, 0.1% Tween 20, 15 g/L glycine and 0.37% HCl, washed with PBS-Tween 0.2% and incubated in blocking buffer for 1h. The absence of residual signal was systematically verified by ECL revelation. To normalize the phosphorylated p42/44 signals, the membranes were probed overnight at 4°C with a rabbit anti-p42/44 antibody recognizing both phosphorylated and unphosphorylated forms (Cell Signaling Technology, #9102) detected as described above. Image Lab software 6.1 (Bio-Rad) was used to quantify the densitometric analyses of the p42/44 signals.

Detection of chymotrypsin in human and mouse samples by Western Blot

For the following WB experiments, different amounts of protein extracts from murine and human gut samples (see below) were loaded to adapt to different chymotrypsin abundance among the samples and to avoid signal saturation. The amount of loaded proteins prepared in laemmli were as follows: 2 μ g and 0.1 μ g for human and murine pancreas, respectively; 25 μ g and 17 μ g for human and mouse feces, respectively; 40 μ g, 50 μ g and 7 μ g for murine colonic scrapings, human mucus and human colonic biopsy, respectively. Protein extracts were then resolved on 4-15% gradient acrylamide gels as described in the previous section. Migration, transfer, blocking, ECL detection, steps were carried out as described above. We systematically performed a first incubation with secondary antibody alone in order to verify the absence of cross-reactivity of this antibody. After this validation, the membranes were incubated with the primary antibody followed by the secondary antibody. To avoid

nonspecific binding, different antibodies were used for human and murine samples. For human samples, the primary antibody was an anti-CTRB1/2 mouse monoclonal IgG (D-5, Santa Cruz, sc-393414) and the secondary antibody was an HRP-coupled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-035-166). For murine samples, we used an anti-CTRB1/2 goat monoclonal IgG (F-13, Santa-Cruz, sc-161496) followed by an HRP-coupled donkey anti-goat IgG (Promega, V8051).

Assay of chymotryptic proteolytic activity

The specific chymotrypsin activity was measured in murine stool and colonic scraping extracts by following the degradation of the chymotrypsin peptide substrate, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-aminomethyl coumarin (AMC). 50 μ L of extracts were placed in a 96 well plates and pre-incubated for 20 min at 37°C. The enzymatic reaction was started by adding an equal volume of 1 mM substrate solution (diluted in 100 mM Tris-HCl pH8, 1 mM CaCl₂) to the samples. Substrate cleavage, leading to free AMC release, was monitored by measuring fluorescence (excitation: 360 nm, emission: 460 nm) every 30 seconds during 20 minutes in a Varioskan Flash microplate reader (ThermoFisher Scientific). The initial velocities of the curves were extracted from the kinetic graphs using the SkanIt™ software (ThermoFisher Scientific). The presence of a specific chymotrypsin-like activity in the samples was confirmed by comparison with the values obtained in the presence of the selective inhibitor chymostatin (500 μ M). The proteolytic activity was quantified in U/mL using a standard curve generated with increasing concentrations of commercial pancreatic chymotrypsin. Proteolytic activity was normalized to protein content measured with a BCA protein assay.

The same protocol was used to measure proteolytic activity in human stool and mucus extracts except that 1mM CHAPS detergent was added to buffer for the dilution of the extracts, substrates and commercial chymotrypsin.

Luciferase assay for measuring release of N-terminally tagged PARs

The ability of chymotrypsin to cleave and release the N-terminal domain of PAR1 and PAR2 was assessed essentially as described previously (Mihara et al. 2016), using CHO cells stably expressing hPAR1 or hPAR2 with a luciferase tag on the N-terminal extremity and luciferase activity was monitored in the cell medium, as follows. CHO-nLuc-PAR1 or PAR2 were plated in 96 well plate at 20 000 cells/well and cultured for 48h. The cells were then washed 3 times with HBSS and incubated with increasing concentrations of chymotrypsin during 10 minutes at 37°C. After exposure to chymotrypsin, cell supernatants potentially containing the cleaved PAR N-terminus (with nLuc tag) were collected and proteolytic activity was stopped by adding 1 mM of the broad-spectrum serine inhibitor AEBSF. Any contaminating cell debris was removed by centrifugation 5 min – 160 g. Using a Varioskan plate reader, luciferase activity was assayed in 50 µL of cell supernatant by recording luminescence during 5 minutes in white 96 well plates, after addition of 50 µL of the luciferase substrate provided in a Luciferase assay kit (Nano-Glo® Luciferase Assay System, N1110, Promega). Luciferase signals were proportional to the amount of PAR cleaved on the cell surface. Luciferase release by chymotrypsin was normalized to the total bioluminescence yielded by untreated cells.

Calcium mobilization assay

CMT93 cells (WT or PAR2^{-/-}) were plated at 20 000 cells/well in black clear-bottomed 96-well plates (Greiner Bio-One, 655090) and grown for 48 hours. Cells were washed 2 times in HBSS (Gibco, 14025092) and incubated for 1h at 37°C with 100 µL of Fluo8 calcium probe (Screen Quest™ Fluo8 calcium AAT bioquest®) prepared following the manufacturer recommendations. After one wash in HBSS, 100 µL of HBSS was added and the cells were stimulated at 37°C while simultaneously monitoring calcium signals using an injector-equipped microplate reader (NOVOstar, BMG Labtech). For all the experiments performed in the absence of extracellular calcium, Ca²⁺-free HBSS (Gibco, 14175095) supplemented with 20 µM EGTA was used during cell stimulations. The recording of the calcium response started 4 sec before cell stimulation (corresponding to the baseline values) and lasted up to 200 seconds. Curves were normalized by dividing each value by the baseline value so each graph is starting at 1. In some experiments, cells were stimulated twice.

For some experiments, antagonists were added before stimulation with chymotrypsin and were continually present until the end of the experiment. For G α antagonists, cells were incubated for 16h with PTX (100 ng/mL), 10 minutes with Y-27632 (10 μ M) or 5 minutes with YM-254890 (10 μ M). The intracellular calcium chelator BAPTA-AM was used at 30 μ M and incubated for 1h with cells prior stimulation with chymotrypsin, its vehicle was 0.03% DMSO. To determine the involvement of CRAC in the calcium response, cells were first incubated during 30 minutes with 10 μ M of the CRAC channel antagonist, BTP2 (vehicle: 0.04% DMSO). Cells were then stimulated with chymotrypsin in calcium-free HBSS. Recording was done every 2s and an injection of CaCl₂ solution was done 4 minutes after the chymotrypsin treatment in order to reach 2 mM calcium concentration, enabling calcium influx from the medium to the cell cytoplasm. The magnitude of this calcium influx was quantified by calculating Area Under the Curves (AUC).

For HEK cells, measurements of calcium signaling induced by synthetic agonist peptides were conducted essentially as described previously (Mihara *et al.* 2016 ; Kawabata *et al.* 1999). Briefly, cells were lifted from a culture flask with EDTA-supplemented calcium-free isotonic phosphate-buffered saline (pH 7.4), washed, and resuspended at approximately 5.10⁷ cells/ml in HBSS supplemented with 10mM HEPES, 1.5mM CaCl₂, and 1.5mM MgCl₂ containing Fluo4 calcium indicator (ThermoFisher Scientific). Agonists were added to 2 mL-stirred cell suspensions in a spectrofluorometer (Perkin-Elmer), and the fluorescence emission signal at 530 nm (excitation wavelength, 480 nm) was measured to follow the intracellular calcium response.

Statistical analyses

All graphical figures and statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 9.4.1 software (GraphPad Software, San Diego, California USA). For single comparisons, statistical differences were assessed with the nonparametric Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. For multiple comparisons, the Friedman test was used, followed by the Dunn's test for multiple comparisons. For disarming experiments, different concentrations of chymotrypsin were tested independently for technical reasons, thus a Kruskal-Wallis test was employed followed by the Dunn's post-test. In all cases the significance level was fixed at p<0.05. Regarding PAR1 and PAR2 cleavage experiments and PAR1 disarming, concentration–

response curves were fitted in GraphPAD with log-transformation of the chymotrypsin concentrations followed by a non-linear regression for normalized responses with a standard Hill slope of 1 (agonist) or -1 (inhibition).

RESULTS

The epithelium is exposed to chymotrypsin activity throughout the intestinal tract

Chymotrypsin has been shown to adsorb easily to the surface of small intestinal epithelial cells without loss of activity (Goldberg, Campbell, and Roy 1968). However, such proximity has never been addressed in the colon where the epithelium is covered by a thick mucus layer. In this context, we first explored the presence of chymotrypsin in protein extracts of different mouse and human colonic compartments by WB analyses. We used antibodies directed against the major pancreatic chymotrypsin form, chymotrypsin B (CTRB). As shown in Figure 1A, in murine pancreatic extracts, we confirmed the presence of a unique signal at 26-kDa that corresponds to the molecular weight of CTRB. As expected, no such signal was detected in lung, since this organ does not express CTRB. In colonic compartments, we found that CTRB signal was immunodetected in stools as well as in colonic mucosal scrapings, but only when the mucosa-associated material, including the mucus layer, were preserved (unwashed). The CTRB signal was indeed not observed in mucosal scrapings realized after extensive elimination of the luminal material. This result shows that the colonic mucosa is not an endogenous producer of CTRB and that this enzyme does not penetrate the epithelium. Similar results were found in human samples, where a specific CTRB signal was clearly visible not only in stools but also in colonic mucus, whereas the human colonic mucosa was negative for CTRB (Figure 1A). These results highly suggest that in physiological conditions, chymotrypsin infiltrates the mucus layer and may reach the surface of the mouse and human colonic epithelium.

To assess whether chymotrypsin protein detected in the different gut compartments was active, we measured chymotrypsin proteolytic activity by enzymatic assay (Figure 1B). Using Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC substrate, we found that human and mouse stools contained a substrate-cleaving activity that was fully inhibited by chymostatin, a specific inhibitor of

chymotrypsin-like activities. As well, chymotrypsin activity was also detected in unwashed mucosal scrapings from mouse and human mucus. Altogether, our data highlight the presence of active chymotrypsin in the vicinity of the colonic epithelium, both in mouse and human. In addition to the small intestine, these findings support that an interaction between chymotrypsin and the surface of IECs might also occur in the distal segments of the GI tract.

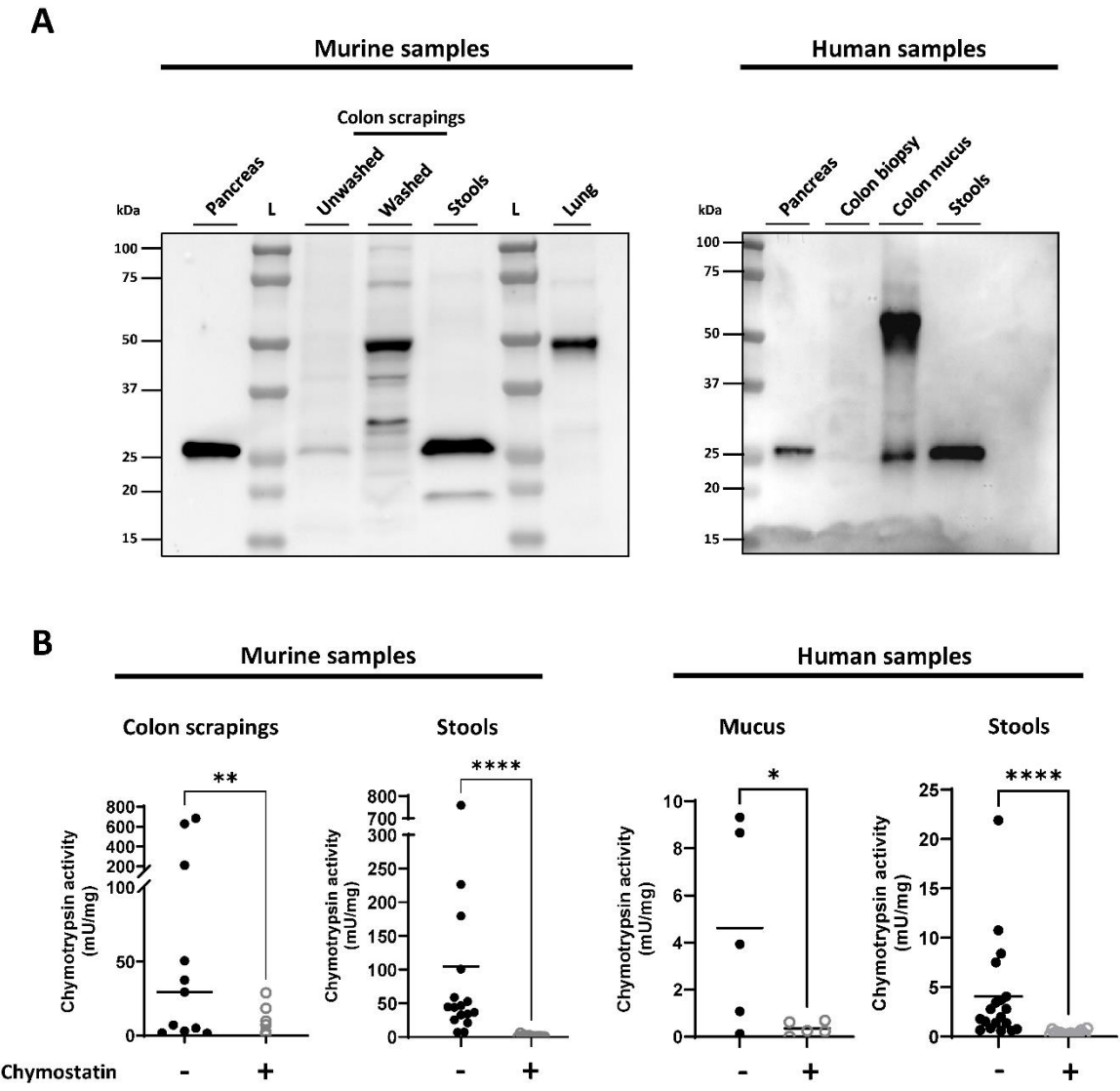


Figure 1. The colonic epithelium is exposed to chymotrypsin activity.

(A) Immunodetection of chymotrypsin B (CTRB) in different gut sub-compartments from mouse samples (left panel) and human samples (right panel) by Western blot. Human and murine pancreas were used as positive controls for CTRB expression (26 kDa) and murine lung was used as a negative control. Different amounts of protein extracts were loaded to adapt to different chymotrypsin abundance among the samples and to avoid signal saturation: 2 µg and 0.1 µg for human and murine pancreas, respectively; 25 µg and 17 µg for human and mouse feces, respectively; 40 µg, 50 µg and 7 µg for murine colonic scrapings, human mucus and human colonic biopsy, respectively. L : Precision plus protein ladder (Bio-Rad). Of note, aspecific signals were visible in extracts from murine lung,

scraping from washed mucosa and human mucus protein. **(B)** Quantification of chymotrypsin-like activities in human and mouse gut sub-compartment samples. Mouse colonic scrapings and stools as well as human mucus and stools were extracted in native conditions and the chymotrypsin-like activities were assayed using Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC as a substrate. The extracts were incubated with or without chymostatin (500 μ M), a specific chymotrypsin-like inhibitor. The initial velocity of the curves was extracted from the kinetic graphs, and the graphs represents the chymotrypsin-like activity in mU/mg protein for each sample. Each dot represents one patient or one mouse. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.0001 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

Chymotrypsin cleaves PAR2 and activates calcium signaling in intestinal epithelial cells

Due to the presence of active chymotrypsin neighbouring the small intestinal and colonic mucosa, we investigated the possible regulation of Protease-activated Receptors (PARs) by chymotrypsin. We focused on PAR1 and PAR2 which are both expressed at the apical surface of IECs (Bohm et al. 1996; Kong et al. 1997; Cenac et al. 2002; Cuffe et al. 2002; Lau et al. 2011).

We first assessed the ability of chymotrypsin to cleave the extracellular domain of PAR2. To do so, CHO cells stably expressing PAR2 receptor fused to a nanoLuciferase tag on its N-terminal extremity were treated with active chymotrypsin. As shown in Figure 2A, incubation of chymotrypsin with the reporter cells led to the release of luciferase activity into the culture medium in a concentration-dependent manner. These data show that chymotrypsin is able to cleave within the N-terminal extremity of PAR2.

We next investigated the ability of chymotrypsin to induce calcium mobilization downstream of PAR2 cleavage in IECs. We used the CMT93 colonic epithelial cell line that endogenously expresses high levels of PAR2 (Nasri et al. 2016). As illustrated in Figure 2B, chymotrypsin was able to generate a concentration-dependent calcium signaling in WT CMT93 cells. This calcium response was completely abolished when PAR2-deficient (PAR2^{-/-}) cells were used. In addition, the use of a PAR2 antagonist (I-191 at 10 μ M) drastically reduced the calcium response (Figure 2C). These experiments reveal that chymotrypsin drives calcium signaling in intestinal epithelial CMT93 cells exclusively *via* PAR2.

We then employed antagonists against the different G α protein subunits known to be involved downstream PAR2 activation (YM-254890 for G α q, Pertussis toxin (PTX) for G α i or Y-27632 for Rho-dependent G α 12/13). Pre-treatment of cells by PTX or Y-27632 had no effect on the chymotrypsin-induced calcium response, whereas YM-254890 prevented it (Figure 3).

This indicates that the calcium mobilization triggered by chymotrypsin *via* PAR2 is totally dependent on Gαq proteins. Together, our results show that chymotrypsin activity is able to cleave PAR2 and trigger a Gαq-dependent calcium signaling in IECs.

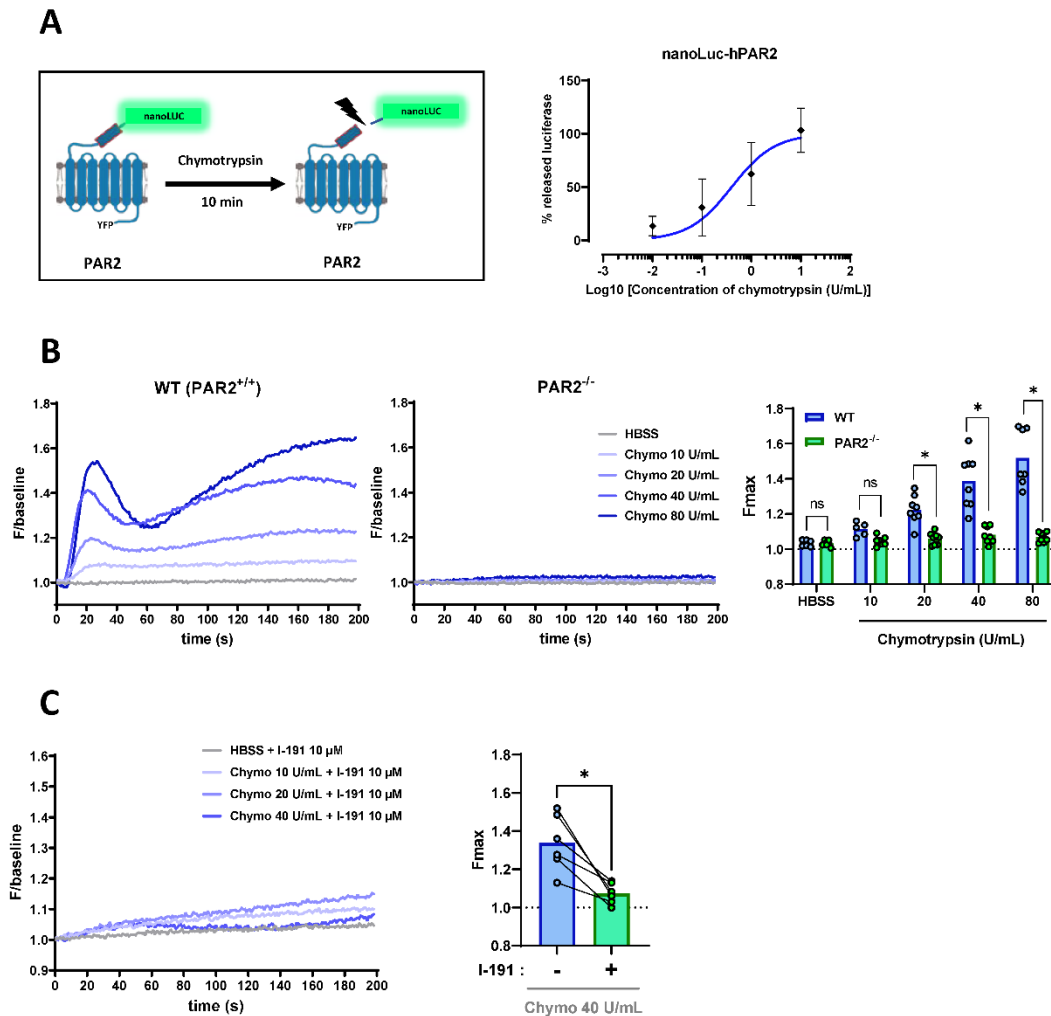


Figure 2. Chymotrypsin cleaves PAR2 and induces calcium signaling in CMT93 intestinal epithelial cells.

(A) Cleavage quantification of the extracellular domain of PAR2. CHO cells stably expressing nanoLuciferase-hPAR2-YFP were incubated with increasing amount of chymotrypsin for 10 min. Luciferase activity was measured in the supernatant and divided by total luciferase activity present in untreated cells. The graph represents the mean \pm SD of the % of released nanoLuciferase activity as a function of chymotrypsin concentration (transformed in Log₁₀). A curve with a standard slope (Hill slope = 1) was represented. The graph represents five independent experiments. (B) Calcium mobilization assays using Fluo8-loaded CMT93 cells treated with increasing amount of chymotrypsin. Injection of chymotrypsin (Chymo) was performed at time 4 seconds. The fluorescence of the calcium Fluo8 probe was recorded over 200 seconds and represents the fluorescent level normalized by the baseline level (F/baseline), which is the level of fluorescence before injection. The calcium response observed in WT CMT93, expressing PAR2 endogenously, was totally abolished in PAR2^{-/-} cells. The maximum fluorescence value (F_{max}) obtained for each concentration of chymotrypsin (right panel) were compared between PAR2^{+/+} and PAR2^{-/-} cells. Each dot on the plot represents one independent

experiment. * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). **(C)** Calcium mobilization assays using Fluo8-loaded CMT93 cells treated with increasing amount of chymotrypsin and the PAR2 antagonist I-191 at 10 μM . The maximum fluorescence values (F_{max}) obtained with 40 U/mL chymotrypsin in the presence or not of I-191 were quantified and compared (right panel). Each dot on the plot represents one independent experiment, paired data are connected by a line. * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

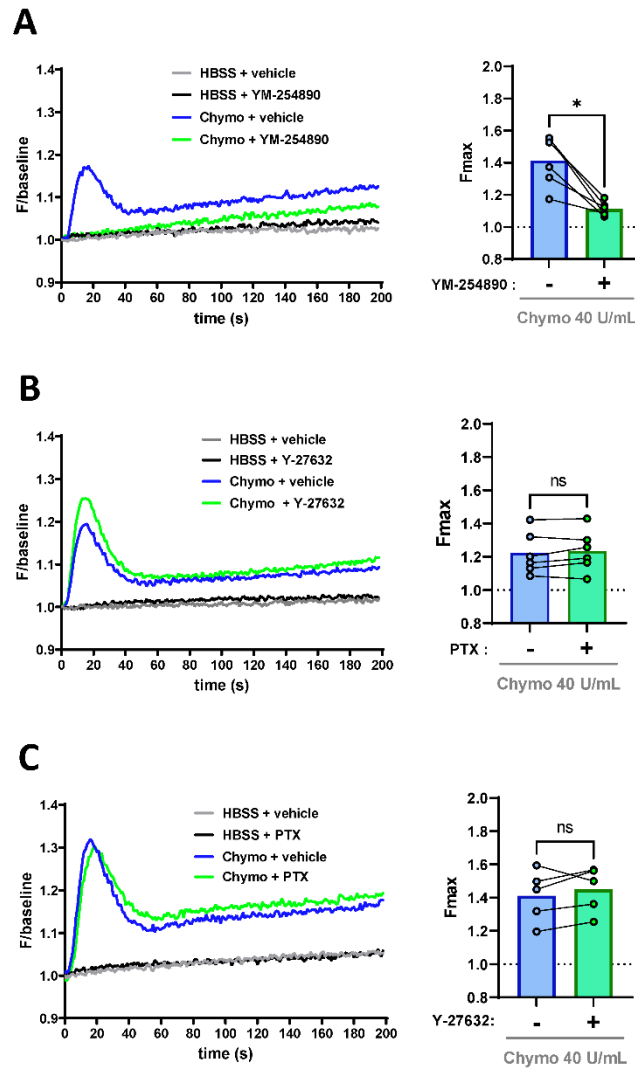


Figure 3. $G_{\alpha q}$ proteins, but not $G_{\alpha 12/13}$ nor $G_{\alpha i}$ proteins are involved in the calcium signal downstream PAR2 activation by chymotrypsin in CMT93 cells.

Calcium mobilization assay using Fluo8-loaded CMT93 cells treated with 40 U/mL chymotrypsin after pre-incubation with G_{α} antagonists: **(A)** YM-254890 ($G_{\alpha q}$ antagonist) at 10 μM during 5 min, **(B)** Y-27632 (Rho-dependent $G_{\alpha 12/13}$ antagonist) at 10 μM for 10 min, or **(C)** PTX ($G_{\alpha i}$ antagonist) at 100 ng/mL for 16h. Vehicles were 0.1% DMSO **(A)** or water **(B-C)**. Profiles are representative of one experiment that was repeated five independent times minimum. The F_{max} obtained for each experiment was plotted on graphs (right-hand panels). * $p < 0.05$; ns: non-significant (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

PAR2 activation by chymotrypsin mediates Store-operated calcium entry (SOCE) in CMT93 cells

Interestingly, the kinetics of the increase in intracellular calcium caused by chymotrypsin differed from the kinetics observed with the PAR2 canonical agonists trypsin or SLIGRL (compare Figure 2B and Supp. Figure S1B, C). These classical activators caused an early peak of intracellular calcium immediately followed by a decrease, without any increase afterwards. In contrast, with chymotrypsin, the first calcium peak was consistently followed by a sustained plateau or increasing phase of calcium signal.

Then, we analyzed in detail the chymotrypsin-induced calcium signal in the goal to determine the involvement of intracellular and/or extracellular calcium. The use of BAPTA-AM, a membrane permeant chelator, that traps the intracellular calcium prevented the signaling induced by chymotrypsin (Figure 4A), demonstrating that chymotrypsin-induced calcium signal is dependent on release from calcium intracellular stores. Then, the use of calcium-free medium during cell stimulation by chymotrypsin significantly lowered the plateau phase while maintaining the first peak of intracellular calcium (Figure 4B). These results strongly suggest that chymotrypsin induces a calcium response initiated by a release of calcium from intracellular stores followed by an influx of calcium from the extracellular medium.

We investigated the role of CRACs (Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels) in this pathway. Indeed, these proteins belong to a family of plasma membrane calcium channels named ORAI that are activated by intracellular store depletion *via* STIM sensors located in the endoplasmic reticulum membranes. The interaction between STIM and ORAI proteins triggers channel opening and subsequent entry of extracellular calcium into the cytosol, a process called Store-Operated Calcium Entry (SOCE) (Yoast, Emrich & Trebak, 2020). We found that all CRAC components: *Orai1*, 2 and 3 channels as well as *Stim1* and *Stim2* were expressed in CMT93 cells (Supp. Figure S2). Therefore, we investigated the role of CRACs in the delayed calcium response using a two-step strategy to uncouple the intracellular store mobilization from the extracellular influx of calcium. As shown in Figure 4C, CMT93 cells were first stimulated with chymotrypsin (arrow) in the absence of extracellular calcium. As expected in these conditions, the protease triggered a calcium mobilization from intracellular stores in cells (as previously observed in Figure 4B, calcium-free conditions). After return to a basal

fluorescence signal, the addition of a Ca^{2+} solution (2 mM final) in the extracellular medium resulted in a substantial entry of calcium into the cells. This calcium influx was quantified by calculating AUC. Pre-treatment of cells with the CRACs antagonist BTP2 significantly reduced the amplitude of calcium influx, showing that chymotrypsin triggered CRAC activation downstream PAR2 in CMT93 cells.

Altogether, our results showed the ability of chymotrypsin to cleave PAR2 and activate a $\text{G}\alpha\text{q}$ -dependent increase in intracellular calcium which is composed of 2 phases: a first release from ER stores, followed by a CRAC-mediated Store-Operated Calcium Entry from the extracellular environment.

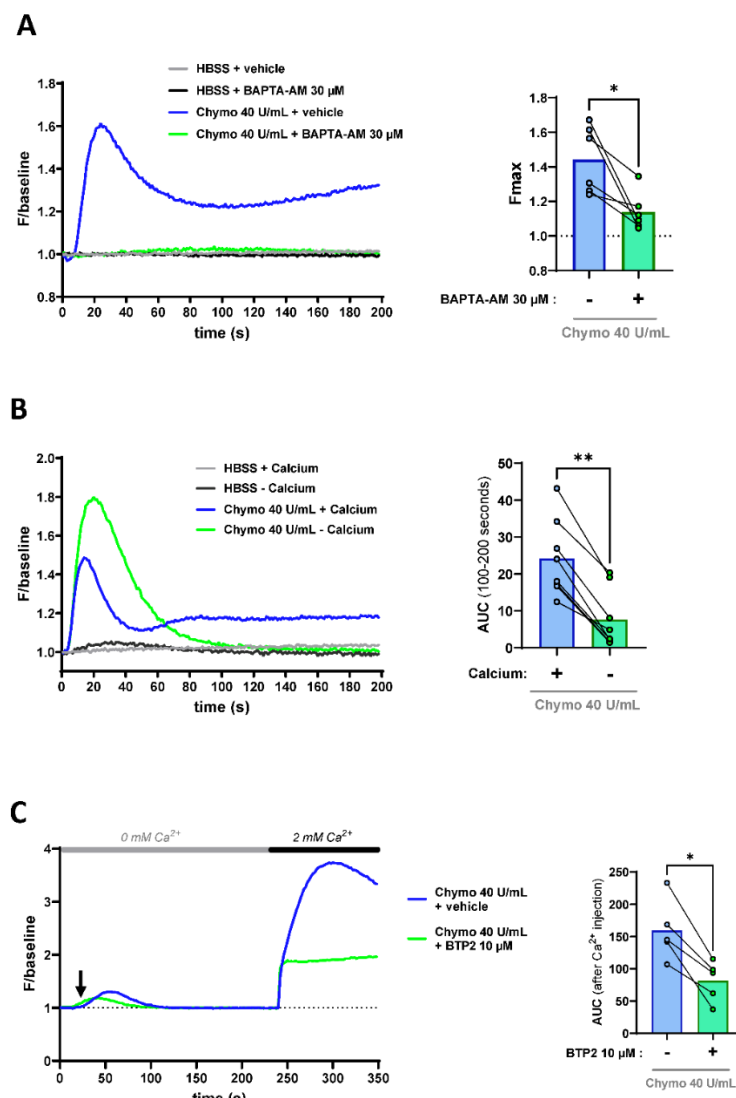


Figure 4. CRAC channels are involved in the long-term calcium influx observed downstream of PAR2 activation by chymotrypsin in CMT93 cells.

(A) Calcium mobilization assays of Fluo8-loaded CMT93 cells stimulated with 40 U/mL chymotrypsin. A pre-treatment of 1h was done with the intracellular calcium chelator BAPTA-AM at 30 μ M or its vehicle (0.03% DMSO). The experiment was performed six independent times and the Fmax of each experiment was reported on the right-hand graph. * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). **(B)** Calcium mobilization assays of Fluo8-loaded CMT93 cells stimulated with 40 U/mL chymotrypsin, in the presence or absence of extracellular calcium (- Calcium). The calcium influx occurring after the initial RE store mobilization was quantified using Area Under the Curves (AUC) from 100 to 200 sec. The graph represents AUC calculated from seven independent experiments. ** $p < 0.01$ (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). **(C)** Calcium mobilization assays of Fluo8-loaded CMT93 cells using a two-step strategy to uncouple the intracellular store mobilization from the extracellular influx. CMT93 cells were first stimulated with chymotrypsin (represented by an arrow) in calcium-free conditions (0 mM Ca^{2+}). The experiment was done in the presence or absence of the CRAC antagonist BTP2 at 10 μ M or its vehicle (0.04% DMSO). Then, 240 seconds after the first stimulation, a CaCl_2 solution was added (2 mM Ca^{2+} final concentration). Curves show the results of one representative experiment repeated five independent times. Calcium influx was quantified by measuring the AUC following CaCl_2 injection (240-350 sec). * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test).

Chymotrypsin activates ERK1/2 signaling downstream of PAR2 in intestinal epithelial cells

In addition to calcium signaling, we also evaluated whether chymotrypsin could activate the ERK1/2 pathway *via* PAR2 in CMT93 cells. For this purpose, we stimulated WT or PAR2^{-/-} CMT93 cells for 10 minutes with different concentrations of chymotrypsin. The ratios between phosphorylated and total ERK1/2 were quantified by WB in the protein extracts to evaluate the ERK1/2 activation levels. Figure 5A shows the ability of chymotrypsin to activate the ERK1/2 signaling pathway specifically *via* PAR2 in CMT93 cells, since the absence of this receptor (PAR2^{-/-}) significantly reduced the ERK1/2 phosphorylation levels. As a control, heat-inactivated chymotrypsin was not able to trigger ERK1/2 activation. Finally, pre-treatment of cells with PTX or YM-254890, but not with Y-27632, significantly reduced the PAR2-dependent ERK1/2 activation caused by chymotrypsin (Figure 5B).

Interestingly, in contrast to chymotrypsin, trypsin was still able to activate ERK1/2 pathway in the absence of PAR2 (Supp. Figure S3). Our data also showed that trypsin could trigger an elevation of intracellular calcium in PAR2^{-/-} CMT93 cells (Supp. Figure S1C). These results highlight functional differences between trypsin and chymotrypsin in terms of molecular targets at the cell surface.

Altogether, our data indicate that the cleavage of PAR2 by chymotrypsin induces ERK1/2 signaling pathway involving G α i and G α q proteins. In addition, in contrast to what was

observed with trypsin, chymotrypsin-associated calcium and ERK1/2 signaling pathways are exclusively dependent on PAR2.

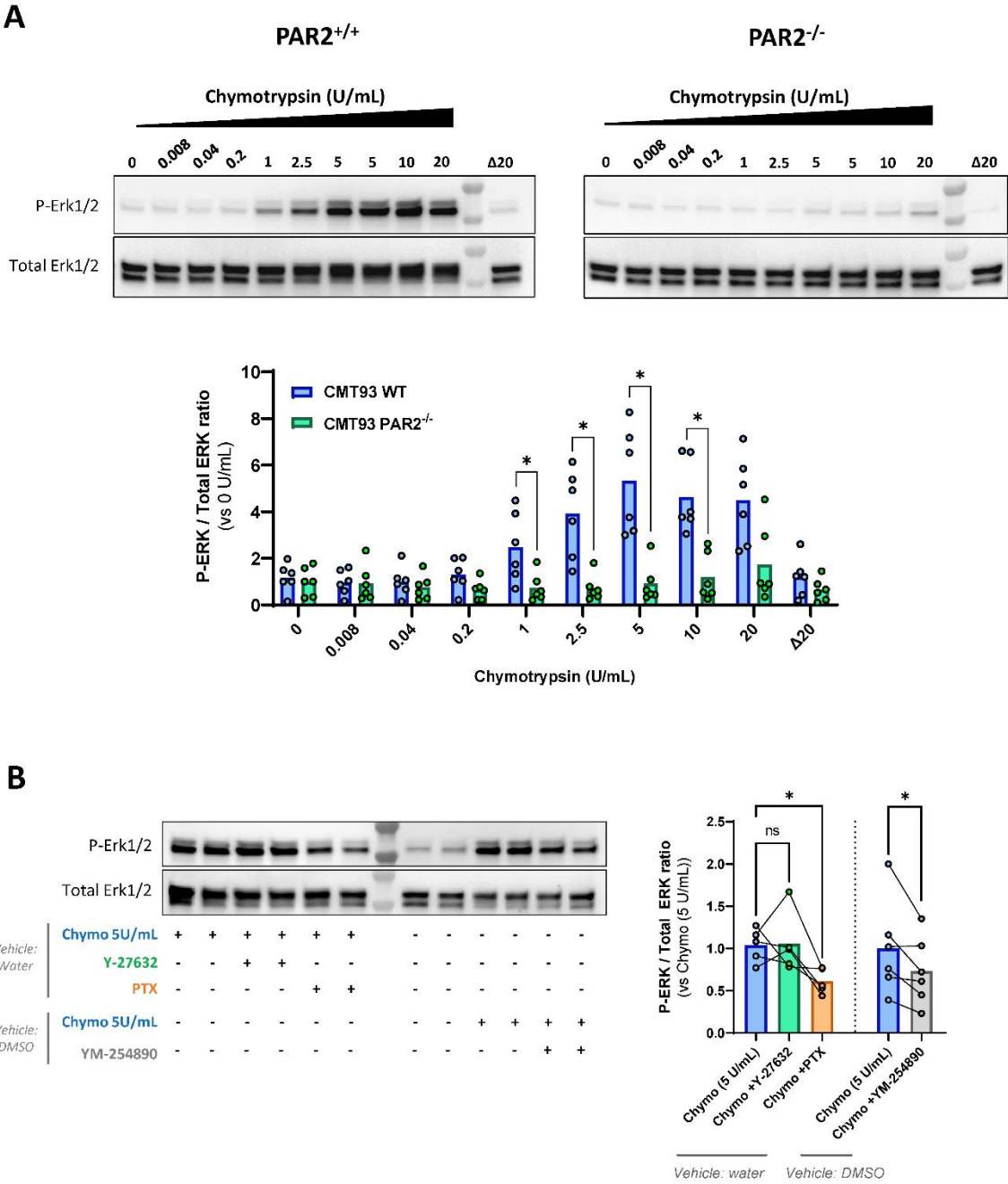


Figure 5. Chymotrypsin activates ERK1/2 signaling pathway *via* PAR2, depending on Gαq and Gαi proteins in intestinal epithelial cells.

(A) Representative immunoblots of ERK1/2 phosphorylation in WT (PAR2^{+/+}) or PAR2^{-/-} CMT93 cells. Cells were treated for 10 min with increasing concentrations of chymotrypsin (0 – 20 U/mL). Heat-inactivated chymotrypsin (20 U/mL) was used as control (Δ20). Cell lysates were analysed by Western blot using anti-Phospho ERK1/2 (P-ERK) antibodies and then anti-total ERK1/2 antibodies. The ratios between P-ERK and total ERK signals were quantified by densitometric analysis and represented on the graph below the blots. Each dot on the plot represents one independent experiment. *p<0.05

(Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). **(B)** ERK1/2 phosphorylation analysed by WB in WT CMT93 cells stimulated for 10 minutes with 5 U/mL chymotrypsin after pre-incubation with G α antagonists: YM-254890 at 10 μ M during 5 min, Y-27632 at 10 μ M for 10 min, or PTX at 100 ng/mL for 16h. Pre-incubations with the corresponding vehicle solutions (0.1% DMSO for YM-254890 or water for Y-27632 and PTX) served as controls. The ratios between P-ERK and total ERK signals were quantified by densitometric analysis and represented on the right-hand panels. Each dot on the plot represents one independent experiment. * p <0.05 (Wilcoxon test for single comparison (effect of YM-254890); Friedman followed by the Dunn's test for multiple comparisons (effects of Y-27632 or PTX)).

Chymotrypsin cleaves PAR2-derived synthetic peptides at a non-canonical site *in vitro* but might use the canonical site in a cellular context

To determine the cleavage sites of PAR2 by chymotrypsin, we performed *in vitro* digestion of a synthetic hPAR2 N-terminal peptide (GTNRSSKGR**SLIGKVD**GTSHVTGKGVT-NH₂) encompassing the canonical tethered ligand sequence (**SLIGKV**) and determined the sequence of the generated cleavage products by HPLC-MS analysis (Figure 6A). This peptide was incubated with 5 U/mL chymotrypsin for 30 minutes. The HPLC peak generated by chymotrypsin corresponded to a cleavage of the parental peptide 2 amino acids downstream of the trypsin canonical R³⁶/S³⁷ cleavage site, i.e. at L³⁸/I³⁹. This generated the **IGKVDGTSHVTGKGVT-NH₂** C-terminal peptide which lacks S³⁷-L³⁸. Intriguingly, the complementary N-terminal peptide (GTNRSSKGR**SL**) was not detected. We suspect that this peptide was rapidly digested by chymotrypsin during these experiments. The two amino acids S³⁷-L³⁸ were described as essential to generate a PAR2-dependent calcium signaling in HEK cells (Ramachandran et al. 2009). We therefore reasoned that the L³⁸/I³⁹ cleavage site, which removes S³⁷-L³⁸, was unlikely to generate the chymotrypsin induced-calcium response. We investigated this hypothesis using HEK cells, a human cell line widely used for the study of PAR pharmacology. We first validated that chymotrypsin was able to generate a calcium signal in WT HEK cells, with a plateau phase as observed in CMT93, which was totally abolished in PAR2^{-/-} cells (Figure 6B). We then constructed a mutant version of hPAR2 obtained after site-directed mutagenesis of wild-type hPAR2 sequence at the canonical site (R³⁶G). This construction was transfected in double PAR1 and PAR2 deficient HEK cells. In those transfected cells, no calcium signal was observed downstream stimulation by chymotrypsin or trypsin, while treatment with the PAR2 agonist peptide 2fLI was still able to trigger a calcium response, validating the functionality of the transfected PAR2 R³⁶G mutant receptors (Figure 6C). These data highly suggest that, in contrast to what happens in the *in vitro* cleavage assay,

chymotrypsin is cleaving at the canonical site of PAR2 to induce calcium signaling *in cellulo*. In line with this idea, our data revealed that neither a short (IGKVDGT-NH₂) nor a long (IGKVDGTSHVTGKGVT-NH₂) synthetic peptide, corresponding to the sequence unmasked by the L³⁸/I³⁹ cleavage site, activated calcium or ERK1/2 signaling in HEK cells (Supp. Figure S4).

Overall, our data suggest that chymotryptic activity is able to cleave PAR2 at the R³⁶/S³⁷ and L³⁸/I³⁹ sites, but only the R³⁶/S³⁷ cleavage site appears to be responsible for the downstream activation of calcium and ERK1/2 signals in living cells.

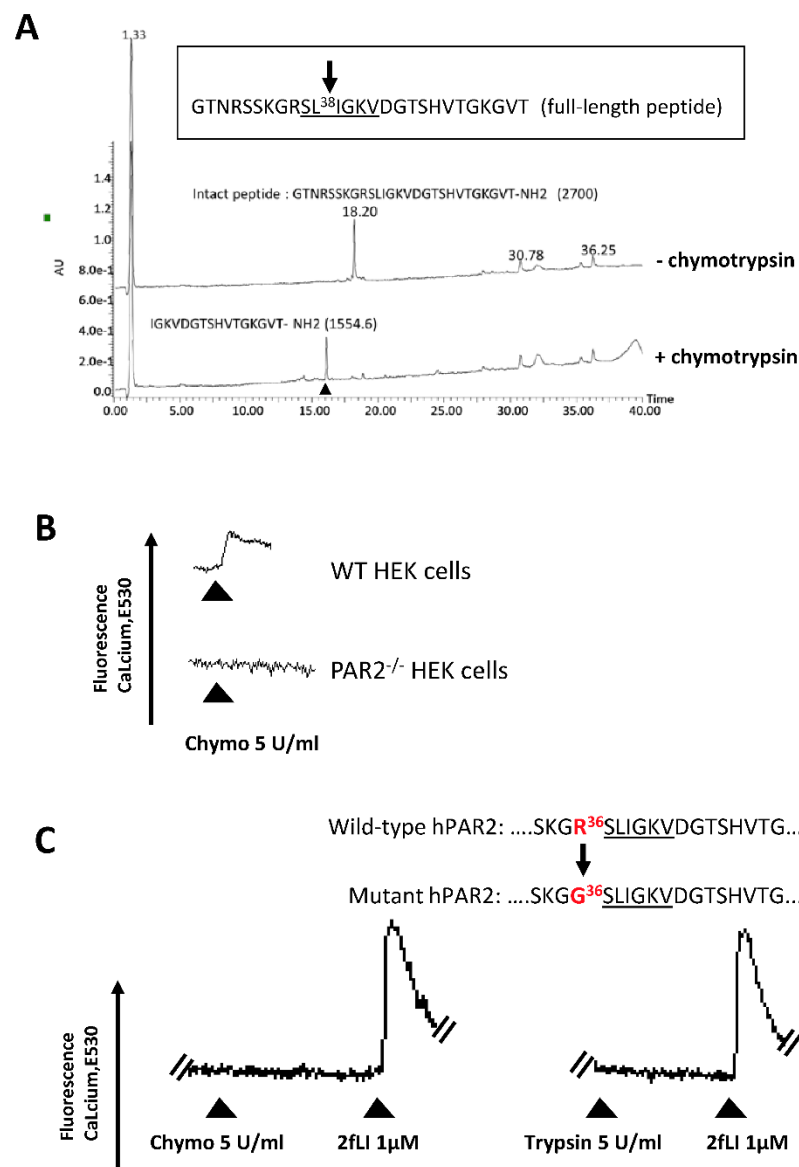


Figure 6. Chymotrypsin cleaves PAR2 at L³⁸/I³⁹ site *in vitro* but the canonical R³⁶/S³⁷ site may drive calcium signaling *in cellulo*.

(A) Determination of the cleavage sites of hPAR2 by chymotrypsin. The human PAR2 N-terminus derived peptide was incubated with chymotrypsin 5 U/mL at 37°C for 30 min and the samples were

fractionated by HPLC followed by MALDI/MS. The HPLC tracing indicates the presence of a cleavage site after L³⁸ and generating the IGKVDGTSHVTGKGVN-NH₂ peptide (arrowhead). The sequence of the tethered ligand is underlined. **(B)** Calcium mobilization assay of Fluo4-loaded WT HEK cells (expressing PAR1 and PAR2) or PAR2^{-/-} HEK cells stimulated with chymotrypsin 5 U/mL. **(C)** Calcium mobilization assay performed on double deficient PAR1^{-/-} and PAR2^{-/-} HEK cells stably transfected with a vector encoding mutant hPAR2 (carrying a mutation at a canonical site (R³⁶G)). Cells were stimulated with 5 U/mL chymotrypsin (left panel) or trypsin (right panel) and then by PAR2 agonist peptide 2fLI (1μM) as a positive control. The data in each panel are representative of five or more independent experiments.

Chymotrypsin disarms PAR1

Since PAR1 is also expressed in IECs, we next explored the possible action of chymotrypsin on this receptor. As done for PAR2, the cleavage of the N-terminal domain of PAR1 was investigated by incubating CHO cells stably expressing nanoLuciferase-hPAR1 with increasing concentrations of chymotrypsin. As illustrated in Figure 7A, chymotrypsin was able to release N-terminal peptides containing luciferase from the tagged PAR1 in a concentration-dependent manner. The PAR1 cleavage site was then determined by *in vitro* digestion of a synthetic hPAR1 N-terminal peptide followed by HPLC-MS analysis. This experiment revealed a unique cleavage site localized within the canonical tethered ligand sequence, at F⁴³/L⁴⁴ (Figure 7B). To investigate the consequences of PAR1 cleavage by chymotrypsin, we took advantage of PAR1 expression and functionality in WT and PAR2^{-/-} CMT93 cells (Nasri et al. 2016). As inferred from our experiments in PAR2-deficient (but PAR1-expressing) CMT93 cells, the cleavage of PAR1 by chymotrypsin did not generate any signaling (Figure 2B and Figure 5A). According to these results, we hypothesized that the chymotrypsin-mediated cleavage of PAR1 within the tethered ligand sequence would disarm rather than activate the receptor.

We therefore investigated the possibility for chymotrypsin to impede further cleavage and signaling induced by thrombin, the canonical activator of PAR1, known to cleave at the R⁴¹/S⁴² site to unmask the tethered ligand SFLLR. In PAR2^{-/-} CMT93 we showed that the thrombin-induced calcium response is totally attributable to PAR1 since the use of the PAR1 antagonist F16357 totally abolished the calcium response (Figure 8A). In order to test the ability of chymotrypsin to prevent the PAR1-mediated calcium response induced by thrombin, we carried out sequential incubations with chymotrypsin and then thrombin (Figure 8B). To prevent the possible degradation of thrombin by chymotrypsin, chymotrypsin was removed before the addition of thrombin. Figure 8C illustrates the calcium response recorded during

the second stimulation of CMT93 cells with thrombin (or HBSS). As a positive control, the pre-incubation of cells with thrombin fully prevented the calcium response induced by a second stimulation with thrombin, due to the desensitization of the receptor (Figure 8C-D). Similarly, the pre-incubation of cells with 10 U/mL chymotrypsin totally abolished the calcium response normally induced by thrombin. This disarming effect was concentration-dependent as illustrated in figure 8E-F, with an IC_{50} of 0.02 U/mL. The functionality of PAR1 in cells pre-treated or not with chymotrypsin remained intact since calcium responses upon addition of TFLLR, the PAR1 agonist peptide, were not significantly impacted (Figure 8G).

Taken together, our study shows that chymotrypsin does not activate PAR1, but instead, prevents thrombin-dependent signaling by cleaving PAR1 two amino acids downstream of the canonical cleavage site.

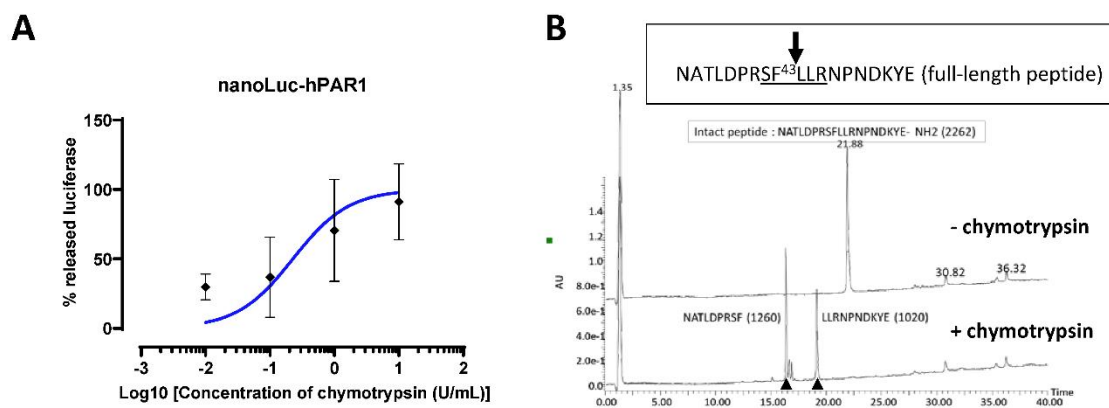


Figure 7. Chymotrypsin cleaves PAR1 N-terminal extremity.

(A) Cleavage quantification of the N-terminal domain of PAR1. CHO cells stably transfected with nLuciferase-hPAR1-YFP were incubated for 10 min with increasing amounts of chymotrypsin (0 to 10 U/mL). Luciferase activity was measured in the supernatant and divided by total luciferase activity of the cells. The graph represents the mean \pm SD of the % of released nanoLuciferase activity as a function of chymotrypsin concentration (transformed in Log10). A curve with a standard slope (Hill slope = 1) was represented. The graph represents five independent experiments. **(B)** Determination of the cleavage sites of hPAR1 by chymotrypsin. The human PAR1 N-terminus-derived peptide was incubated in the absence (- chymotrypsin) or presence of chymotrypsin 5 U/mL (+ chymotrypsin) for 30 min at 37°C and the samples were fractionated by HPLC followed by MALDI/MS. HPLC/MS analysis indicates the presence of 2 peptides derived from the full-length parental peptide (arrowheads), and reveals a unique and unambiguous cleavage site after F⁴³, 2 amino acids after the canonical cleavage site. The sequence of the tethered ligand is underlined. The profile is representative of five or more experiments.

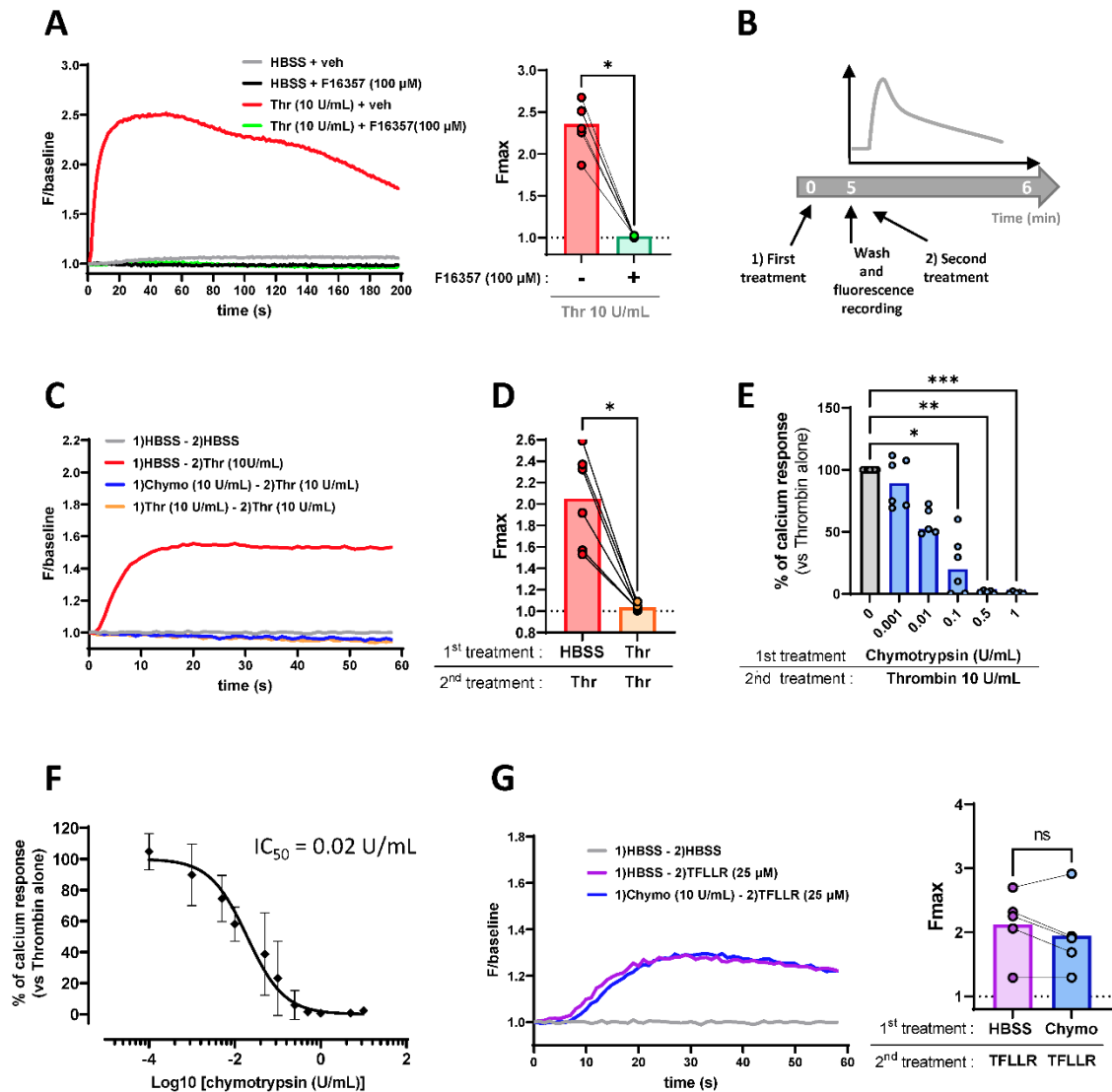


Figure 8. Chymotrypsin disarms PAR1 in intestinal epithelial cells.

(A) Calcium flow experiments performed in Fluo8–loaded PAR2^{-/-} CMT93 cells (expressing PAR1 endogenously). Cells were stimulated with 10 U/mL thrombin (Thr) with or without the PAR1 antagonist F16357 at 100 μ M. Vehicle (veh): 0.5% DMSO. The maximum fluorescence value (Fmax) obtained with thrombin \pm F16357 for each experiment was reported on the right-hand graph. * p <0.05 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (B) Experimental design of PAR1 disarming experiments. Fluo8–loaded PAR2^{-/-} CMT93 cells were first treated with chymotrypsin or its vehicle (1). Five minutes later, the cell supernatant was replaced by HBSS and the recording of calcium signal started. A second stimulation (2) was performed with 10 U/mL thrombin or 25 μ M PAR1-activating peptide (TFLLR) and the calcium signal was recorded during 60 seconds. (C) Representative calcium response curves of PAR1 disarming by chymotrypsin (blue line) and desensitization by thrombin in PAR2^{-/-} CMT93 (orange line). (D) Quantification of thrombin-induced PAR1 desensitization. The Fmax values were quantified and reported on the graph. * p <0.05 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). (E) Quantification of the chymotrypsin-induced PAR1 disarming effect. PAR2^{-/-} CMT93 cells were pre-incubated with increasing amount of chymotrypsin and then stimulated with thrombin during calcium mobilization assays as explained in (B). The Fmax induced by thrombin after incubation with chymotrypsin was compared to the value obtained with thrombin alone and expressed in %. * p <0.05 ; ** p <0.005 ; ***<0.001 (Kruskal-Wallis followed by the Dunn’s test). (F) Concentration-response curve of PAR1

disarming by chymotrypsin in PAR2^{-/-} CMT93. The Y axis represents the percentage of the response induced by thrombin alone. The curve was generated after log-transformation of the chymotrypsin concentrations, followed by a non-linear regression for normalized responses with a standard Hill slope fixed at -1. The calculated IC₅₀ was 0.020 U/mL with a 95% confidence interval of [0.013; 0.030]. **(G)** Representative calcium response curves of Fluo8-loaded PAR2^{-/-} CMT93 cells pre-treated or not with 10 U/ml chymotrypsin and then stimulated with the PAR1 agonist peptide TFLLR (25 μM) as described in (B). The F_{max} obtained with TFLLR after pre-incubation or not with chymotrypsin was reported on the right-hand graph. *p<0.05 (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). Each panel represents five or more independent experiments.

DISCUSSION

Our manuscript describes for the first time a signaling role for pancreatic chymotrypsin that we found present and active in the vicinity of the colonic epithelium. The potential intracellular signals resulting from the interaction between chymotrypsin and the intestinal epithelial cells had never been explored so far. Our study clearly demonstrates that PAR1 and PAR2, two GPCRs expressed at the surface of IECs, are cleaved by this digestive enzyme. While the cleavage of PAR2 by chymotrypsin is able to transduce important intracellular signalling pathways, PAR1 cleavage prevents further signaling in response to thrombin, its canonical agonist (general schematic representation in Figure 9).

In addition to the small intestine, our data show that the apical side of the colonic epithelium is neighbored by active chymotrypsin under physiological conditions. Nevertheless, we observed a high heterogeneity in chymotrypsin activity present in feces and mucus-containing extracts. This variability might be explained by the fact that pancreatic juice is not permanently secreted into the gut lumen, but regulated by food intake through humoral and neuronal controls (Singer and Niebergall-Roth 2009). A similar variation was also observed in another study analysing the chymotrypsin activity content in infant stools (Remtulla, Durie, and Goldberg 1986). Accordingly, the molecular pathways that we describe in this study involving chymotrypsin and its cleaving activity on PAR1/2 are likely to operate physiologically in the gut, but in a discontinuous manner.

Our results demonstrate that chymotrypsin activates intracellular calcium signaling and ERK1/2 pathways exclusively through PAR2 in the IEC cell line CMT93. Knowing that PAR2 has been shown to exert pleiotropic functions, one can predict an array of physiological

consequences chymotrypsin could have on gut homeostasis. *In vivo*, the intraluminal administration of PAR2 activators has been observed to increase epithelial paracellular permeability (Roka et al. 2007; Cenac et al. 2002). In addition, publications have also reported that stimulation of PAR2 in IEC cell lines triggers electrolyte transport, chemokine or eicosanoid secretion and inhibition of cytokine-induced apoptosis (van der Merwe, Hollenberg, and MacNaughton 2008; Kong et al. 1997; Iablokov et al. 2014; Tanaka et al. 2008). Regarding chymotrypsin, one study has revealed that this enzyme triggered a decrease of ion permeability in SCBN cells, which was dependant on PKC-zeta activation but not on PAR2 (Swystun et al. 2009). Functional studies will be needed in the future to address the role of the chymotrypsin-PAR2 axis in the context of gut epithelial cells.

From a mechanistic point of view, we found that chymotrypsin activated ERK1/2 pathway downstream PAR2, *via* G α i and G α q proteins. PAR2 activation by chymotrypsin also triggered calcium signaling through the classically described G α q-dependent pathway. Interestingly, this calcium response was biphasic with an initial intracellular ER store source followed by a CRAC-dependent, long-lasting calcium influx from the extracellular medium. This profile was not observed in CMT93 cells treated with the canonical PAR2 agonist, trypsin (Suppl. Figure S1), where the prompt increase in cytosolic calcium was immediately followed by a decrease in the calcium response never rising up afterwards. This difference in the calcium profiles was even more pronounced in renal-derived cells (HEK), that we also used to explore the pharmacology of PARs (compare Figure 6B and trypsin response seen in Kawabata *et al.* (Kawabata et al. 1999). This SOCE activation could be of importance knowing that this process may potentiate or prolongate the effects of the primary calcium response (Targos, Baranska, and Pomorski 2005).

Our data suggested that both chymotrypsin and trypsin may use the same canonical R³⁶/S³⁷ cleavage site to generate a calcium signaling *via* PAR2. Thus, the divergent calcium profiles between these enzymes are hard to explain but could be attributed either to differences in the interaction between the enzyme and PAR2 or to a concomitant action of chymotrypsin on a cell membrane target not affected by trypsin. In line with this concept, Kaiserman *et al.* showed that despite cleaving at the PAR2 canonical site, Granzyme K (GzmK) and trypsin had opposite effects, GzmK being unable to induce any calcium signaling while inducing ERK phosphorylation (Kaiserman et al. 2022). This result emphasises the complexity

of proteolytic signaling mechanisms and underlines that identifying the sole PAR2 cleavage site is not sufficient to predict which downstream signaling pathways will be activated by a protease. Furthermore, our HPLC-MS analysis identified a major cleavage site for chymotrypsin on the PAR2 N-terminus at L³⁸/I³⁹. If occurring in living cells, this cleavage does not appear to drive calcium or ERK1/2 signaling according to our results (Supp. Figure S4). However, this cleavage could represent a way to limit PAR2 activation. This hypothesis could explain the lower magnitude of the calcium response induced by chymotrypsin compared to trypsin in CMT93 cells (compare Figure 2B and Supp. Figure S1C). In the literature, the cleavage of PAR2 at the L³⁸/I³⁹ site has been reported to induce eosinophil degranulation, *via* an aspartate protease activity produced by a fungus (Matsuwaki et al. 2009). Therefore, depending on the cell context, the L³⁸/I³⁹ cleavage site on PAR2 may or may not exhibit functional effects.

Based on the existing PAR2 pharmacology literature, it appears that pancreatic chymotrypsin stands out from other proteases with chymotrypsin-like activity. Indeed, while the neutrophil protease Cathepsin G (CatG) disarms PAR2, KLK7 was unable to activate or disarm PAR2 in KNRK cells (De Bruyn et al. 2021; Stefansson et al. 2008). Chymase, another chymotrypsin-like protease, was unable to activate PAR2 in keratinocytes (Schechter et al. 1998). Therefore, a picture that emerges from literature is that chymotrypsin-like activities are generally either disarming or without effect towards PAR2. However, our study contradicts this concept. Importantly, Schechter and colleagues also found that chymotrypsin was not able to activate PAR2, a result that is opposite to ours and which highlights the importance of the cellular context.

Our work clearly demonstrates that in addition to being a PAR2 activator, chymotrypsin is a very efficient PAR1-disarming protease by cleaving the receptor 2 amino acids downstream of the canonical site, at F⁴³/L⁴⁴. This makes thrombin unable to signal *via* PAR1 anymore. Our study is in agreement with previous work, which showed that a synthetic peptide corresponding to the PAR1 N-terminal region 38-60 was cleaved at the same F⁴³/L⁴⁴ site by chymotrypsin (Parry et al. 1996). However, the functional outcome of such a cleavage occurring on the whole receptor expressed on living cells had not been evaluated. The disarming of calcium signals that we report here also provides a functional explanation to pioneering experiments in the 1980s, which showed that platelets previously exposed to

pancreatic chymotrypsin exhibited a delayed thrombin-induced aggregation (Tam, Fenton, and Detwiler 1980). Previous studies reported that cathepsin G and chymase also had the ability to disarm PAR1 (Schechter et al. 1998; De Bruyn et al. 2021; Molino et al. 1995; Renesto et al. 1997). Therefore, a PAR1 disarming effect appears to be a common characteristic of chymotrypsin-like proteases.

Interestingly, in our experiments, the IC₅₀ for PAR1 disarming by chymotrypsin was very low, i.e. 0.02 U/mL (corresponding to 12 nM), a concentration at which no effect on PAR2 is observed. Similarly, Parry and colleagues concluded that, despite a lower cleavage efficiency, the affinity of chymotrypsin for PAR1 was equivalent to that of thrombin, making PAR1 a very good chymotrypsin substrate (Parry et al. 1996). These observations suggest that, under physiological conditions, pancreatic chymotrypsin present in the lumen could disarm PAR1 well before activating PAR2. The physiological effect of this disarming remains to be elucidated, but since thrombin has been shown to be secreted in the gut lumen by IECs (Motta et al. 2019; Motta, Palese, et al. 2021; Motta, Deraison, et al. 2021), PAR1 activation and disarming actions are relevant at the apical side of the epithelium. In human organoids, PAR1 cleavage by thrombin has been associated with increased epithelial cell maturation and apoptosis (Sebert et al. 2018). In contrast, Darmoul *et al.* linked PAR1 expression with a cancerous context (Darmoul et al. 2003). The same group reported that activation of PAR1 by thrombin or its agonist peptide TFLLR drives proliferation of HT29 cells (Darmoul et al. 2004). Chymotrypsin, by disarming PAR1, could therefore have anti-apoptotic or anti-proliferative effects depending on the context (primary versus cancerous IECs). In summary, our results suggest that chymotrypsin could be a major regulator of PAR1 and PAR2 activity at the intestinal epithelium surface.

CONCLUSION

Taken together, our results clearly define chymotrypsin as a luminal protease of the gut that neighbours the colonic epithelium, where PARs are expressed. We show that in intestinal epithelial cells, chymotrypsin cleaves the extracellular domains of PAR2 and PAR1 and thereby transduces or prevents intracellular signals, respectively. Our data define a new potential role of luminal chymotrypsin as a regulator of gut epithelial signaling. Future work is

thus warranted to determine the role of chymotrypsin signaling in intestinal inflammation and cancer.

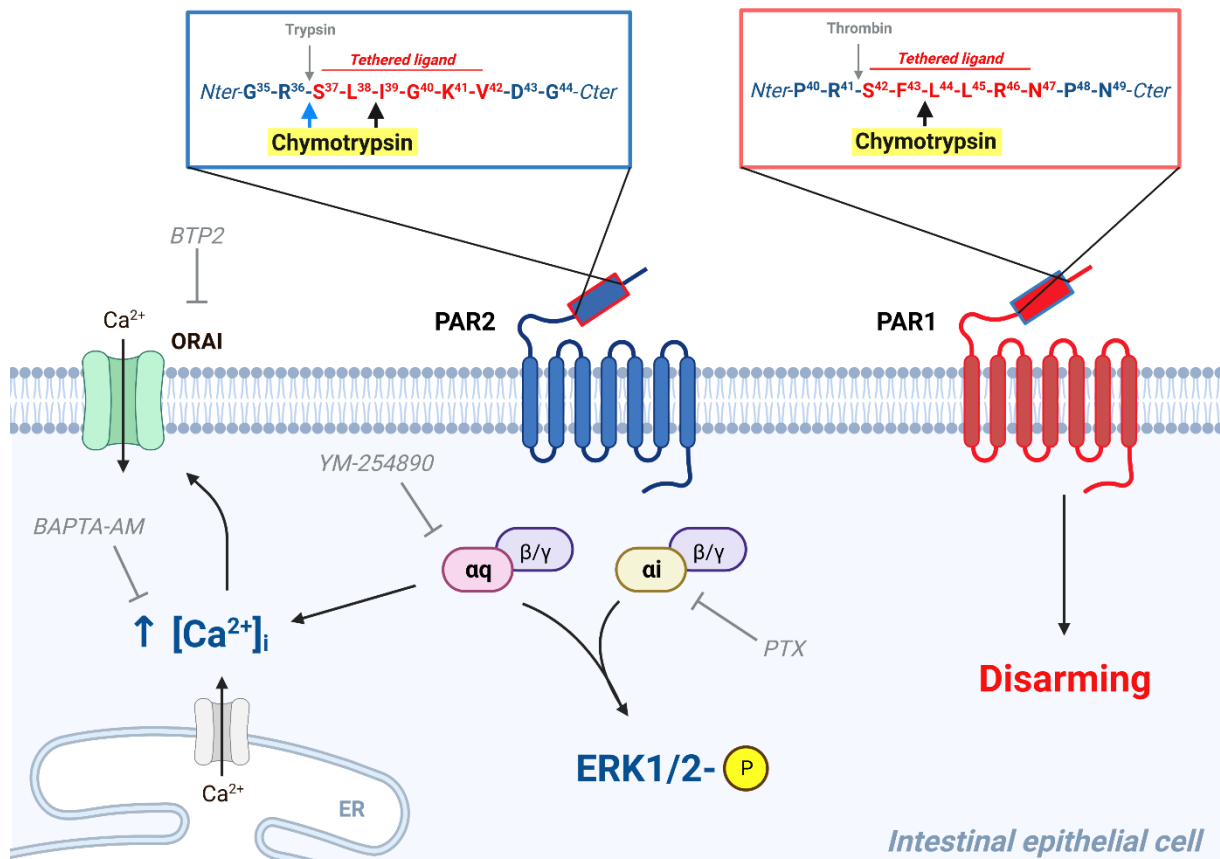


Figure 9. Schematic representation of chymotrypsin interactions with PAR1 and PAR2 at the surface of intestinal epithelial cells CMT93.

Pancreatic chymotrypsin is able to cleave both PAR1 and PAR2. *In vitro*, the cleavage of PAR2 by chymotrypsin occurs at an atypical site (L³⁸/I³⁹) located within the tethered ligand sequence (dark arrow). However, in a cell context, this protease might use the PAR2 canonical R³⁶/S³⁷ cleavage site to trigger calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation (blue arrow). The ERK activation is partially mediated by Gαq and Gαi proteins, whereas calcium signaling is fully dependent on Gαq. This calcium mobilization is composed of an initial ER store release followed by a long-lasting CRAC activation (Ca²⁺-Release-Activated Ca²⁺ Channel), enabling calcium entry from the extracellular medium. Conversely, chymotrypsin disarms PAR1 for further activation by its canonical activator thrombin by cleaving within the PAR1 tethered ligand at the F⁴³/L⁴⁴ bond (dark arrow). Adapted from "Activation of Protein Kinase C (PKC)", by BioRender.com (2022). Retrieved from (Publication License: NN2566RCT9)

References

- Adams, M. N., R. Ramachandran, M. K. Yau, J. Y. Suen, D. P. Fairlie, M. D. Hollenberg, and J. D. Hooper. 2011. 'Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors', *Pharmacol Ther*, 130: 248-82.
- Alexander, S. P., A. Christopoulos, A. P. Davenport, E. Kelly, A. Mathie, J. A. Peters, E. L. Veale, J. F. Armstrong, E. Faccenda, S. D. Harding, A. J. Pawson, C. Southan, J. A. Davies, M. P. Abbracchio, W. Alexander, K. Al-Hosaini, M. Back, N. M. Barnes, R. Bathgate, J. M. Beaulieu, K. E. Bernstein, B. Bettler, N. J. M. Birdsall, V. Blaho, F. Boulay, C. Bousquet, H. Brauner-Osborne, G. Burnstock, G. Calo, J. P. Castano, K. J. Catt, S. Ceruti, P. Chazot, N. Chiang, B. Chini, J. Chun, A. Cianciulli, O. Civelli, L. H. Clapp, R. Couture, Z. Csaba, C. Dahlgren, G. Dent, K. D. Singh, S. D. Douglas, P. Dournaud, S. Eguchi, E. Escher, E. J. Filardo, T. Fong, M. Fumagalli, R. R. Gainetdinov, M. Gasparo, C. Gerard, M. Gershengorn, F. Gobeil, T. L. Goodfriend, C. Goudet, K. J. Gregory, A. L. Gundlach, J. Hamann, J. Hanson, R. L. Hauger, D. L. Hay, A. Heinemann, M. D. Hollenberg, N. D. Holliday, M. Horiuchi, D. Hoyer, L. Hunyady, A. Husain, I. Jzerman AP, T. Inagami, K. A. Jacobson, R. T. Jensen, R. Jockers, D. Jonnalagadda, S. Karnik, K. Kaupmann, J. Kemp, C. Kennedy, Y. Kihara, T. Kitazawa, P. Kozielowicz, H. J. Kreienkamp, J. P. Kukkonen, T. Langenhan, K. Leach, D. Lecca, J. D. Lee, S. E. Leeman, J. Leprince, X. X. Li, T. L. Williams, S. J. Lolait, A. Lupp, R. Macrae, J. Maguire, J. Mazella, C. A. McArdle, S. Melmed, M. C. Michel, L. J. Miller, V. Mitolo, B. Mouillac, C. E. Muller, P. Murphy, J. L. Nahon, T. Ngo, X. Norel, D. Nyimanu, A. M. O'Carroll, S. Offermanns, M. A. Panaro, M. Parmentier, R. G. Pertwee, J. P. Pin, E. R. Prossnitz, M. Quinn, R. Ramachandran, M. Ray, R. K. Reinscheid, P. Rondard, G. E. Rovati, C. Ruzza, G. J. Sanger, T. Schoneberg, G. Schulte, S. Schulz, D. L. Segaloff, C. N. Serhan, L. A. Stoddart, Y. Sugimoto, R. Summers, V. P. Tan, D. Thal, W. W. Thomas, Pbmwm Timmermans, K. Tirupula, G. Tulipano, H. Unal, T. Unger, C. Valant, P. Vanderheyden, D. Vaudry, H. Vaudry, J. P. Vilardaga, C. S. Walker, J. M. Wang, D. T. Ward, H. J. Wester, G. B. Willars, T. M. Woodruff, C. Yao, and R. D. Ye. 2021. 'THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2021/22: G protein-coupled receptors', *Br J Pharmacol*, 178 Suppl 1: S27-S156.
- Bohm, S. K., W. Kong, D. Bromme, S. P. Smeekens, D. C. Anderson, A. Connolly, M. Kahn, N. A. Nelken, S. R. Coughlin, D. G. Payan, and N. W. Bunnnett. 1996. 'Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2', *Biochem J*, 314 (Pt 3): 1009-16.
- Borgstrom, B., A. Dahlqvist, G. Lundh, and J. Sjovall. 1957. 'Studies of intestinal digestion and absorption in the human', *J Clin Invest*, 36: 1521-36.
- Buresi, M. C., E. Schleichauf, N. Vergnolle, A. Buret, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, and W. K. MacNaughton. 2001. 'Protease-activated receptor-1 stimulates Ca(2+)-dependent Cl(-) secretion in human intestinal epithelial cells', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281: G323-32.
- Caminero, A., J. L. McCarville, H. J. Galipeau, C. Deraison, S. P. Bernier, M. Constante, C. Rolland, M. Meisel, J. A. Murray, X. B. Yu, A. Alaedini, B. K. Coombes, P. Bercik, C. M. Southward, W. Ruf, B. Jabri, F. G. Chirido, J. Casqueiro, M. G. Surette, N. Vergnolle, and E. F. Verdu. 2019. 'Duodenal bacterial proteolytic activity determines sensitivity to dietary antigen through protease-activated receptor-2', *Nat Commun*, 10: 1198.
- Canivet, C., S. Gourgou-Bourgade, B. Napoleon, L. Palazzo, N. Flori, P. Guibert, G. Piessen, D. Farges-Bancel, J. F. Seitz, E. Assenat, V. Vendrely, S. Truant, G. Vanbiervliet, P. Berthelemy, S. Garcia, A. Gomez-Brouchet, L. Buscail, B. Bournet, and Bacap Consortium. 2018. 'A prospective clinical and biological database for pancreatic adenocarcinoma: the BACAP cohort', *BMC Cancer*, 18: 986.

- Cenac, N., A. M. Coelho, C. Nguyen, S. Compton, P. Andrade-Gordon, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, N. W. Bunnett, R. Garcia-Villar, L. Bueno, and N. Vergnolle. 2002. 'Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2', *Am J Pathol*, 161: 1903-15.
- Chin, A. C., N. Vergnolle, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, and A. G. Buret. 2003. 'Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 11104-9.
- Cuffe, J. E., M. Bertog, S. Velazquez-Rocha, O. Dery, N. Bunnett, and C. Korbmacher. 2002. 'Basolateral PAR-2 receptors mediate KCl secretion and inhibition of Na⁺ absorption in the mouse distal colon', *J Physiol*, 539: 209-22.
- D'Andrea, M. R., C. K. Derian, D. Leturcq, S. M. Baker, A. Brunmark, P. Ling, A. L. Darrow, R. J. Santulli, L. F. Brass, and P. Andrade-Gordon. 1998. 'Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues', *J Histochem Cytochem*, 46: 157-64.
- Darmoul, D., V. Gratio, H. Devaud, T. Lehy, and M. Laburthe. 2003. 'Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells', *Am J Pathol*, 162: 1503-13.
- Darmoul, D., V. Gratio, H. Devaud, F. Peiretti, and M. Laburthe. 2004. 'Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation', *Mol Cancer Res*, 2: 514-22.
- De Bruyn, M., H. Ceuleers, N. Hanning, M. Berg, J. G. De Man, P. Hulpiau, C. Hermans, U. H. Stenman, H. Koistinen, A. M. Lambeir, B. Y. De Winter, and I. De Meester. 2021. 'Proteolytic Cleavage of Bioactive Peptides and Protease-Activated Receptors in Acute and Post-Colitis', *Int J Mol Sci*, 22.
- Dulon, S., C. Cande, N. W. Bunnett, M. D. Hollenberg, M. Chignard, and D. Pidard. 2003. 'Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28: 339-46.
- Goldberg, D. M., R. Campbell, and A. D. Roy. 1968. 'Binding of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa', *Biochim Biophys Acta*, 167: 613-5.
- Goldberg, D. M. 1969. 'Fate of trypsin and chymotrypsin in the human small intestine', *Gut*, 10: 477-83.
- Hollenberg, M. D., K. Mihara, D. Polley, J. Y. Suen, A. Han, D. P. Fairlie, and R. Ramachandran. 2014. 'Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease', *Br J Pharmacol*, 171: 1180-94.
- Holzhausen, M., L. C. Spolidorio, R. P. Ellen, M. C. Jobin, M. Steinhoff, P. Andrade-Gordon, and N. Vergnolle. 2006. 'Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of Porphyromonas gingivalis infection', *Am J Pathol*, 168: 1189-99.
- Iablokov, V., C. L. Hirota, M. A. Peplowski, R. Ramachandran, K. Mihara, M. D. Hollenberg, and W. K. MacNaughton. 2014. 'Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) decreases apoptosis in colonic epithelial cells', *J Biol Chem*, 289: 34366-77.
- Kaiserman, D., P. Zhao, C. L. Rowe, A. Leong, N. Barlow, L. T. Joeckel, C. Hitchen, S. E. Stewart, M. D. Hollenberg, N. Bunnett, A. Suhrbier, and P. I. Bird. 2022. 'Granzyme K initiates IL-6 and IL-8 release from epithelial cells by activating protease-activated receptor 2', *PLoS One*, 17: e0270584.
- Kawabata, A., M. Saifeddine, B. Al-Ani, L. Leblond, and M. D. Hollenberg. 1999. 'Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands', *J Pharmacol Exp Ther*, 288: 358-70.
- Kong, W., K. McConalogue, L. M. Khitin, M. D. Hollenberg, D. G. Payan, S. K. Bohm, and N. W. Bunnett. 1997. 'Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 8884-9.

- Lau, C., C. Lytle, D. S. Straus, and K. A. DeFea. 2011. 'Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium', *Am J Physiol Cell Physiol*, 300: C113-23.
- Matsuwaki, Y., K. Wada, T. A. White, L. M. Benson, M. C. Charlesworth, J. L. Checkel, Y. Inoue, K. Hotta, J. U. Ponikau, C. B. Lawrence, and H. Kita. 2009. 'Recognition of fungal protease activities induces cellular activation and eosinophil-derived neurotoxin release in human eosinophils', *J Immunol*, 183: 6708-16.
- Mihara, K., R. Ramachandran, B. Renaux, M. Saifeddine, and M. D. Hollenberg. 2013. 'Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger G protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (PAR1)', *J Biol Chem*, 288: 32979-90.
- Mihara, K., R. Ramachandran, M. Saifeddine, K. K. Hansen, B. Renaux, D. Polley, S. Gibson, C. Vanderboor, and M. D. Hollenberg. 2016. 'Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling', *Mol Pharmacol*, 89: 606-14.
- Molino, M., N. Blanchard, E. Belmonte, A. P. Tarver, C. Abrams, J. A. Hoxie, C. Cerletti, and L. F. Brass. 1995. 'Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G', *J Biol Chem*, 270: 11168-75.
- Motta, J. P., A. Denadai-Souza, D. Sagnat, L. Guiraud, A. Edir, C. Bonnart, M. Sebbag, P. Rousset, A. Lapeyre, C. Seguy, N. Mathurine-Thomas, H. J. Galipeau, D. Bonnet, L. Alric, A. G. Buret, J. L. Wallace, A. Dufour, E. F. Verdu, M. D. Hollenberg, E. Oswald, M. Serino, C. Deraison, and N. Vergnolle. 2019. 'Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms', *Nat Commun*, 10: 3224.
- Motta, J. P., C. Deraison, S. Le Grand, B. Le Grand, and N. Vergnolle. 2021. 'PAR-1 Antagonism to Promote Gut Mucosa Healing in Crohn's Disease Patients: A New Avenue for CVT120165', *Inflamm Bowel Dis*, 27: S33-S37.
- Motta, J. P., S. Palese, C. Giorgio, K. Chapman, A. Denadai-Souza, P. Rousset, D. Sagnat, L. Guiraud, A. Edir, C. Seguy, L. Alric, D. Bonnet, B. Bournet, L. Buscail, C. Gilletta, A. G. Buret, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, E. Oswald, E. Barocelli, S. Le Grand, B. Le Grand, C. Deraison, and N. Vergnolle. 2021. 'Increased Mucosal Thrombin is Associated with Crohn's Disease and Causes Inflammatory Damage through Protease-activated Receptors Activation', *J Crohns Colitis*, 15: 787-99.
- Nasri, I., D. Bonnet, B. Zwarycz, E. d'Aldebert, S. Khou, R. Mezghani-Jarraya, M. Quaranta, C. Rolland, C. Bonnart, E. Mas, A. Ferrand, N. Cenac, S. Magness, L. Van Landeghem, N. Vergnolle, and C. Racaud-Sultan. 2016. 'PAR2-dependent activation of GSK3beta regulates the survival of colon stem/progenitor cells', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 311: G221-36.
- Nguyen, C., A. M. Coelho, E. Grady, S. J. Compton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, N. Cenac, R. Garcia-Villar, L. Bueno, M. Steinhoff, N. W. Bunnett, and N. Vergnolle. 2003. 'Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism', *Can J Physiol Pharmacol*, 81: 920-7.
- Nystedt, S., K. Emilsson, A. K. Larsson, B. Strombeck, and J. Sundelin. 1995. 'Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2', *Eur J Biochem*, 232: 84-9.
- Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt, and J. Sundelin. 1994. 'Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 9208-12.
- Nystedt, S., A. K. Larsson, H. Aberg, and J. Sundelin. 1995. 'The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression', *J Biol Chem*, 270: 5950-55.
- Oikonomopoulou, K., K. K. Hansen, M. Saifeddine, I. Tea, M. Blaber, S. I. Blaber, I. Scarisbrick, P. Andrade-Gordon, G. S. Cottrell, N. W. Bunnett, E. P. Diamandis, and M. D. Hollenberg. 2006. 'Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling', *J Biol Chem*, 281: 32095-112.
- Pandol, S. J. 2010. *The Exocrine Pancreas* (San Rafael (CA)).
- Parry, M. A., T. Myles, J. Tschopp, and S. R. Stone. 1996. 'Cleavage of the thrombin receptor: identification of potential activators and inactivators', *Biochem J*, 320 (Pt 1): 335-41.

- Peach, C. J., L. E. Edgington-Mitchell, N. W. Bunnett, and B. L. Schmidt. 2023. 'Protease-activated receptors in health and disease', *Physiol Rev*, 103: 717-85.
- Ramachandran, R., C. Altier, K. Oikonomopoulou, and M. D. Hollenberg. 2016. 'Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling', *Pharmacol Rev*, 68: 1110-42.
- Ramachandran, R., K. Mihara, H. Chung, B. Renaux, C. S. Lau, D. A. Muruve, K. A. DeFea, M. Bouvier, and M. D. Hollenberg. 2011. 'Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2)', *J Biol Chem*, 286: 24638-48.
- Ramachandran, R., K. Mihara, M. Mathur, M. D. Rochdi, M. Bouvier, K. Defea, and M. D. Hollenberg. 2009. 'Agonist-biased signaling via proteinase activated receptor-2: differential activation of calcium and mitogen-activated protein kinase pathways', *Mol Pharmacol*, 76: 791-801.
- Ramachandran, R., F. Noorbakhsh, K. Defea, and M. D. Hollenberg. 2012. 'Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges', *Nat Rev Drug Discov*, 11: 69-86.
- Reinhardt, C., M. Bergental, T. U. Greiner, F. Schaffner, G. Ostergren-Lunden, L. C. Petersen, W. Ruf, and F. Backhed. 2012. 'Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling', *Nature*, 483: 627-31.
- Remtulla, M. A., P. R. Durie, and D. M. Goldberg. 1986. 'Stool chymotrypsin activity measured by a spectrophotometric procedure to identify pancreatic disease in infants', *Clin Biochem*, 19: 341-7.
- Renesto, P., M. Si-Tahar, M. Moniatte, V. Balloy, A. Van Dorsselaer, D. Pidard, and M. Chignard. 1997. 'Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor', *Blood*, 89: 1944-53.
- Roka, R., J. Demaude, N. Cenac, L. Ferrier, C. Salvador-Cartier, R. Garcia-Villar, J. Fioramonti, and L. Bueno. 2007. 'Colonic luminal proteases activate colonocyte proteinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice', *Neurogastroenterol Motil*, 19: 57-65.
- Schechter, N. M., L. F. Brass, R. M. Lavker, and P. J. Jensen. 1998. 'Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts', *J Cell Physiol*, 176: 365-73.
- Sebert, M., A. Denadai-Souza, M. Quaranta, C. Racaud-Sultan, S. Chabot, P. Lluet, N. Monjotin, L. Alric, G. Portier, S. Kirzin, D. Bonnet, A. Ferrand, and N. Vergnolle. 2018. 'Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a protease-activated receptor 1- and protease-activated receptor 4-dependent mechanism', *Br J Pharmacol*, 175: 3656-68.
- Sebert, M., N. Sola-Tapias, E. Mas, F. Barreau, and A. Ferrand. 2019. 'Protease-Activated Receptors in the Intestine: Focus on Inflammation and Cancer', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 717.
- Singer, M. V., and E. Niebergall-Roth. 2009. 'Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: role of enteropancreatic reflexes and cholecystikinin', *Cell Biol Int*, 33: 1-9.
- Smith, J. S., I. Ediss, M. A. Mullinger, and A. Bogoch. 1971. 'Fecal chymotrypsin and trypsin determinations', *Can Med Assoc J*, 104: 691-4 passim.
- Stefansson, K., M. Brattsand, D. Roosterman, C. Kempkes, G. Bocheva, M. Steinhoff, and T. Egelrud. 2008. 'Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases', *J Invest Dermatol*, 128: 18-25.
- Swystun, V. A., B. Renaux, F. Moreau, S. Wen, M. A. Peplowski, M. D. Hollenberg, and W. K. MacNaughton. 2009. 'Serine proteases decrease intestinal epithelial ion permeability by activation of protein kinase Czeta', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297: G60-70.
- Tam, S. W., J. W. Fenton, 2nd, and T. C. Detwiler. 1980. 'Platelet thrombin receptors. Binding of alpha-thrombin is coupled to signal generation by a chymotrypsin-sensitive mechanism', *J Biol Chem*, 255: 6626-32.
- Tanaka, Y., F. Sekiguchi, H. Hong, and A. Kawabata. 2008. 'PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 622-26.
- Targos, B., J. Baranska, and P. Pomorski. 2005. 'Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells', *Acta Biochim Pol*, 52: 397-409.

- van der Merwe, J. Q., M. D. Hollenberg, and W. K. MacNaughton. 2008. 'EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294: G441-51.
- Vergnolle, N. 2005. 'Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut', *Gut*, 54: 867-74.
- Vergnolle, N. 2016. 'Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases', *Gut*.

**Guignard *et al.* - Chymotrypsin activity signals to intestinal epithelium by
Protease-Activated Receptor-dependent mechanisms**

Supporting information

Supplementary materials

RNA extraction, Reverse transcription and semi-quantitative PCR

Sub-confluent CMT93 cells grown in 25cm² flask were trypsinized, resuspended in complete medium, and washed twice in PBS. Cell pellet was resuspended in 1 mL Trizol and total RNA was extracted following instructions of the manufacturer. Reverse transcription reaction was performed with 3 µg RNA using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific). PCR was performed using RedExtract-N-Amp™ PCR Ready Mix (Sigma-Aldrich), using a 1/10 dilution of cDNA, primers were at 625 nM in the reaction mix. The PCR program started with an initial denaturation step at 94°C for 3 minutes followed by 30 cycles of the following program: denaturation 94°C for 30'', annealing at 60°C for 30 seconds, and elongation at 72°C for 30 seconds. A final elongation step was performed at 72°C for 7 minutes. All amplicons were below 200 bp-length. PCR products were resolved on a 2% agarose gel electrophoresis. Ladder was 100 pb ladder from Promega.

Primer sequences were as follows: *mOrai1* forward 5' CCTGGCGCAAGCTCTACTTA 3' ; *mOrai1* Reverse 5' CCCTGGTGGGTAGTCATGG 3' ; *mOrai2* Forward 5' GGAGGAAGCTCTACCTGAGCA 3' ; *mOrai2* Reverse 5' GGGCTGAGGGTACTGGTACTT 3' ; *mOrai3* Forward 5' CCTCCAGCCGCACATCT 3' ; *mOrai3* Reverse 5' AGCAGGCCTGGTGGGTAT 3' ; *mStim1* Forward 5' GTGGATGACATGGATGAGGAG 3' ; *mStim1* Reverse 5' GGAATGGGTCAAATCCCTCT 3' ; *mStim2* Forward 5' GATGACCTCGATGAAGACACAC 3' ; *mStim2* Reverse 5' CTGAGACTGTGGGGAGGATG 3'.

Stimulation of HEK cells with peptides derived from Chymotrypsin-mediated major cleavage site on PAR2

To assess ERK1/2 phosphorylation, WT HEK cells were plated in 24-well multiwell plates, cultured overnight, then washed and placed in serum-free DMEM for 18 h. Cells were then incubated during 10 min at 37°C with different concentrations of a short (IGKVDGT-NH₂) or a long (IGKVDGTSHVTGKGVN-NH₂) synthetic peptide, corresponding to the sequence unmasked by the L³⁸/I³⁹ cleavage site. Chymotrypsin and 2fLI were used as positive controls. At the end of incubation, cells were placed on ice and washed with PBS prior lysis in cold lysis buffer. The cell lysates were transferred to microcentrifuge tubes and cleared by centrifugation (15 000 g for 10 min at 4°C). The protein samples were heat-denatured at 92 °C for 3 min in denaturing Laemmli buffer, resolved on 8–20% gradient SDS-PAGE gels (Invitrogen TG gel) and proteins were transferred on nitrocellulose membranes. ERK1/2 phosphorylation was then monitored as described in Mihara *et al.* (Mihara et al., 2013).

Measurements of calcium signaling induced by synthetic agonist peptides in WT HEK cells were conducted as described in the Material and Methods section of the core manuscript.

Supplementary figures

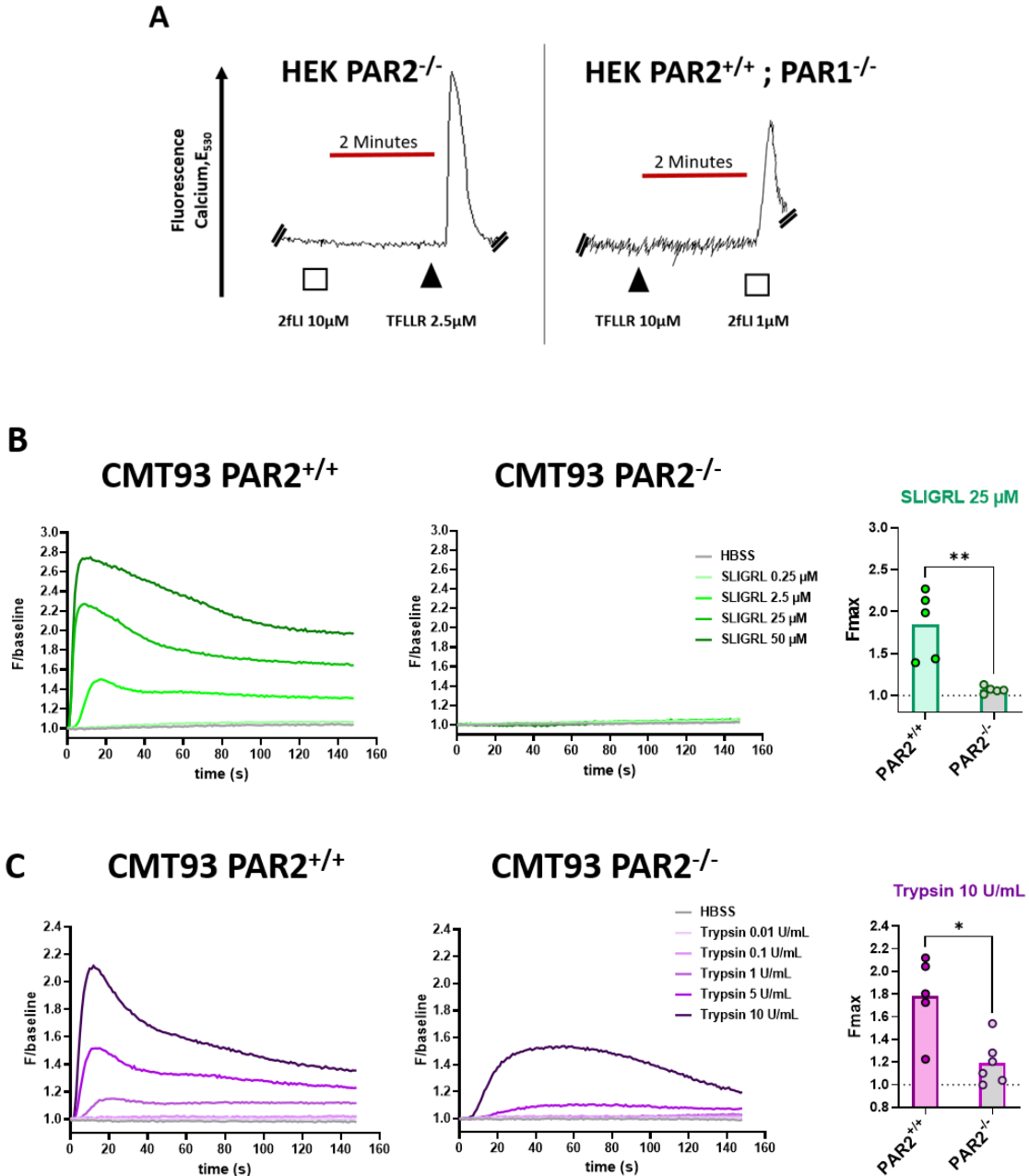


Figure S1. Validation of PAR2 deficiency in HEK293 and CMT93 knockout cells.

(A) Calcium mobilization assays performed in Fluo4-loaded PAR2-deficient (PAR2^{-/-}) or PAR1-deficient (PAR1^{-/-}) HEK cells. In brief, PAR2^{-/-} HEK cells still expressing PAR1 were sequentially stimulated with the PAR2 agonist peptide (2fLI) and, 2 minutes later, with the PAR1 agonist peptide (TFLLR). Inversely, PAR1^{-/-} HEK cells still expressing PAR2 were firstly stimulated with TFLLR and then 2fLI. Data are representative of 5 or more independent experiments with the PAR1 and PAR2-null HEK cells. (B-C) Calcium profiles of Fluo4-loaded WT (PAR2^{+/+}) and PAR2^{-/-} CMT93 cells in response to increasing concentrations of SLIGRL (B) or trypsin (C). The maximum fluorescence values (Fmax) obtained with 25 μ M SLIGRL and 10 U/mL Trypsin in WT and PAR2^{-/-} cells were quantified (right panels, 5 or more independent experiments). Each dot on the plot represents one independent experiment. * p <0.05 ; ** p <0.01 (Mann-Whitney test).

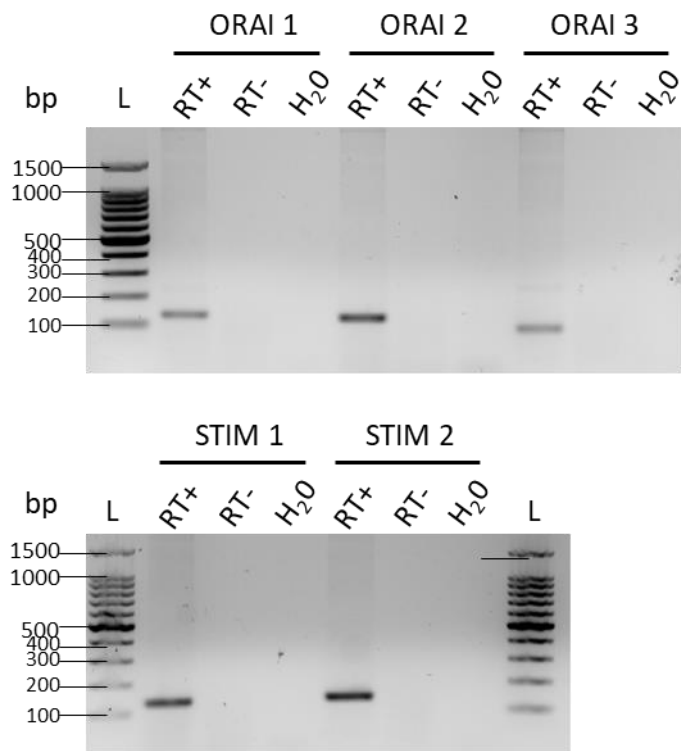


Figure S2. CRAC channels (*Orai*) and sensors (*Stim*) are expressed in CMT93 cells. CMT93 cells were lysed and total RNA was extracted. Reverse transcription was performed in the presence (RT+) or absence (RT-) of a reverse transcriptase enzyme. Semi-quantitative PCR was performed using primers to amplify CRAC channels (*Orai1*, *Orai2* and *Orai3*) and sensors (*Stim1*, and *Stim2*). Amplicons were resolved on a 1% agarose gel. L: 100 bp ladder (Promega). Representative gel of five independent experiments.

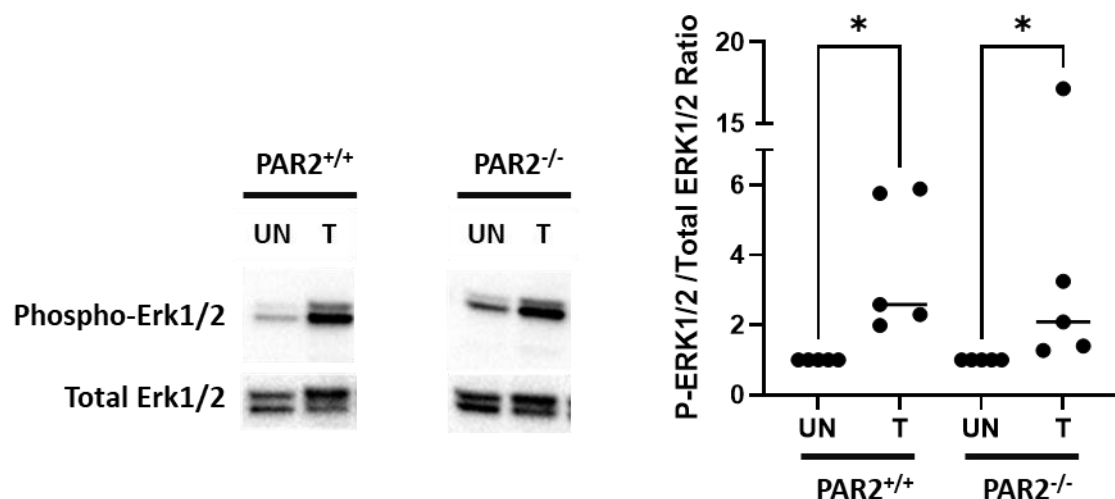


Figure S3. Trypsin is able to induce ERK1/2 phosphorylation independently of PAR2 in CMT93 cells.

WT (PAR2^{+/+}) or PAR2^{-/-} CMT93 cells grown in 6-well plates were stimulated with 10 U/mL trypsin for 10 minutes. After cell lysis, 15 µg proteins were resolved on a 4-15% gradient acrylamide gel. WB analysis was performed using anti-phospho-ERK1/2 and then anti-total ERK1/2. Ratios between phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 were calculated by densitometric analysis and are reported on a graph, normalised at 1 for the untreated condition. Un: Untreated, T: trypsin 10 U/mL. Five independent experiments were performed. Friedman test followed by the Dunn's test for multiple comparisons was performed (*p<0.05).

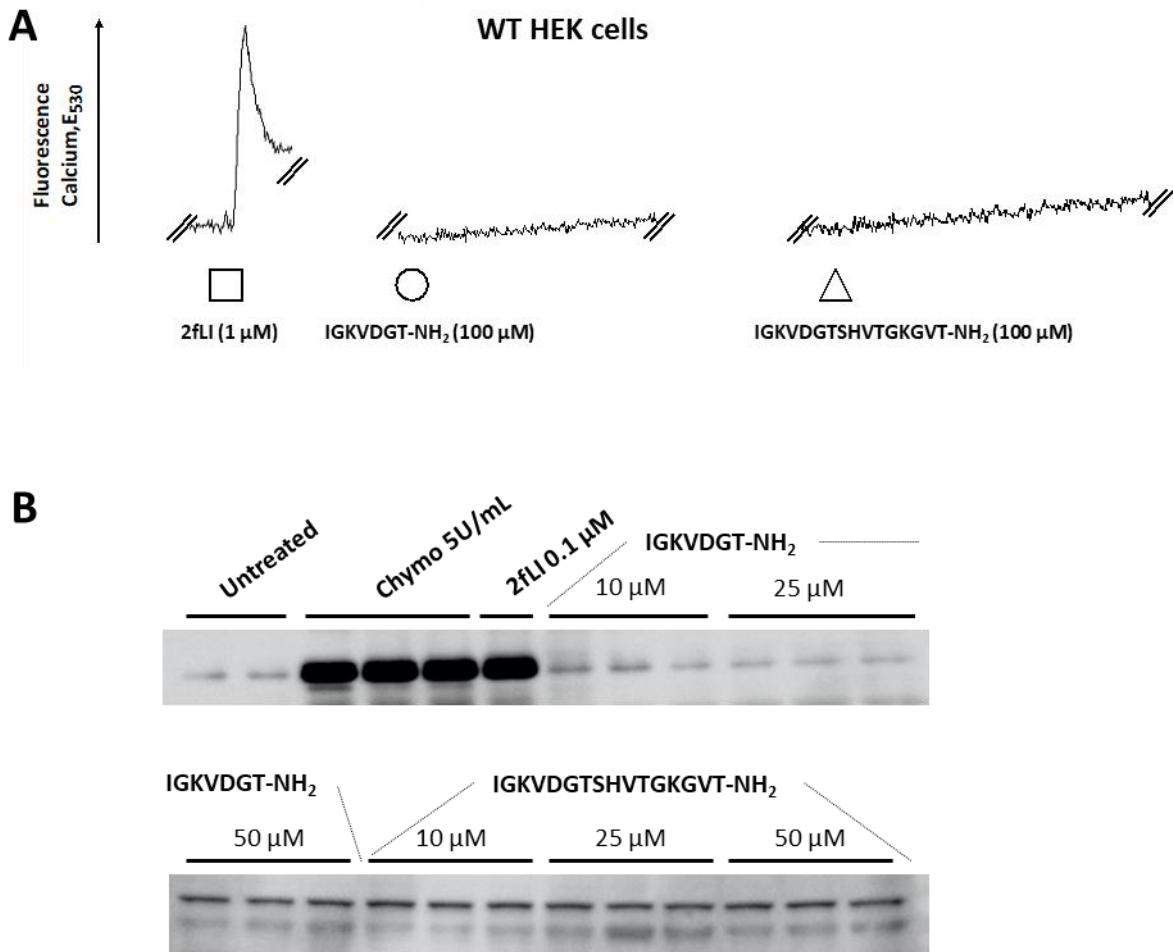


Figure S4. PAR2 peptides derived from the L³⁸/I³⁹ cleavage are not able to activate PAR2.

(A) Calcium mobilization assay of Fluo8-loaded HEK cells stimulated with PAR2 agonist peptide 2fLI or with a short (IGKVDGT-NH₂) or a long (IGKVDGTSHVTGKGVT-NH₂) peptide derived from the L³⁸/I³⁹ cleavage site of PAR2. **(B)** Representative immunoblots of ERK1/2 phosphorylation in WT HEK cells. Cells were stimulated or not with either chymotrypsin (Chymo 5U/ml), or PAR2 agonist peptide 2fLI (0.1 μ M) or with the short (IGKVDGT-NH₂) or the long (IGKVDGTSHVTGKGVT-NH₂) receptor-derived peptides (at 10, 25 or 50 μ M). Cell protein extracts were analysed by WB using anti-phospho-ERK1/2 antibody. Each panel is representative of five or more independent experiments.

Résultats complémentaires : interaction de la chymotrypsine avec les récepteurs PAR3 et PAR4

Introduction

Deux autres récepteurs complètent la famille des PARs : PAR3 et PAR4. Ces récepteurs sont tous deux exprimés au sein du tissu intestinal, mais par des types cellulaires différents.

PAR4 a initialement été décrit comme un récepteur à la thrombine, mais peut aussi être activé par d'autres protéases comme la trypsine [392]. De plus, l'expression de PAR4 a été rapportée à la surface des cellules épithéliales coliques chez l'Homme et la souris et pourrait donc, en plus de PAR1 et PAR2, représenter une cible additionnelle pour la chymotrypsine luminale [294], [295].

PAR3 est sans doute le récepteur le moins bien décrit de cette famille. Bien que clivé efficacement par la thrombine, aucune autre protéase n'a été décrite comme pouvant l'activer. De plus, sa capacité à transduire une signalisation intracellulaire de manière autonome est très débattue dans la littérature [393]. L'identification des protéases clivant ce récepteur est donc d'intérêt prégnant d'un point de vue pharmacologique. PAR3 n'est pas présent à la surface de l'épithélium intestinal, mais il est très exprimé par les neurones sensitifs qui innervent les organes périphériques, y compris le tractus digestif [283], [286]. Son rôle précis reste cependant très énigmatique. Les corps cellulaires des neurones sensitifs innervant l'intestin sont regroupés dans les ganglions de la racine dorsale (Dorsal Root Ganglion : DRG) situés le long de la colonne vertébrale. De manière intéressante, les afférences de ces neurones sont retrouvées jusque dans la muqueuse intestinale, y compris au contact des cellules épithéliales [394]. En condition physiologique, il semble peu probable que la chymotrypsine interagisse avec PAR3. En revanche, en condition inflammatoire, lorsque la barrière épithéliale est altérée, ce récepteur pourrait être exposé au contenu luminal incluant cette enzyme.

En plus de l'étude pharmacologique focalisée sur PAR1 et PAR2 qui a fait l'objet de l'article décrit dans la section précédente, nous avons également caractérisé l'aptitude de la chymotrypsine à cliver et à activer les récepteurs PAR3 et PAR4.

Résultats

Caractérisation du clivage de PAR3 et PAR4 par la chymotrypsine

Nous avons précédemment montré que la chymotrypsine était capable de cliver PAR1 et PAR2 et ainsi de réguler la signalisation de ces récepteurs à la surface des cellules épithéliales intestinales. Nous avons poursuivi cette étude pharmacologique en caractérisant la capacité de cette enzyme à cliver les récepteurs PAR3 et PAR4. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules CHO exprimant stablement PAR3 ou PAR4 fusionnés avec une nanoluciférase (nLuc) à leur extrémité N-terminale extracellulaire. Ces cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de chymotrypsine (Figure 37A).

Comme présenté en Figure 37B, l'incubation des CHO exprimant PAR3 avec la chymotrypsine (Chymo) a mené à un relargage de luciférase dans le surnageant cellulaire. Ce clivage est totalement dépendant de l'activité de l'enzyme puisqu'il a été aboli en présence de chymostatine (CST), un inhibiteur spécifique d'activité chymotrypsique. De manière intéressante, il atteignait un plateau à environ 60% de la quantité totale de PAR3 disponible à la surface cellulaire dès 0,1 U/mL de chymotrypsine. Ces résultats ont été confirmés dans une lignée cellulaire rénale murine « KNRK » transfectées avec la même construction (Figure 37C). Une augmentation significative du signal luciférase a été retrouvée, confirmant le clivage du récepteur PAR3 par la chymotrypsine.

En revanche, la fonctionnalité de la construction PAR4-nLuc n'a pas pu être validée dans la lignée CHO, ni même dans la lignée KNRK. En effet, aucune des protéases testées, incluant la thrombine qui est l'activateur canonique de PAR4, n'a été capable d'induire un relargage de la luciférase dans le surnageant de ces cellules, suggérant que la construction n'est pas fonctionnelle. Ensemble, ces données indiquent donc que la chymotrypsine est capable de cliver le domaine N-terminal extracellulaire de PAR3. Cependant, la mise au point ultérieure d'une construction fonctionnelle sera nécessaire pour pouvoir étudier le clivage de PAR4 par la chymotrypsine.

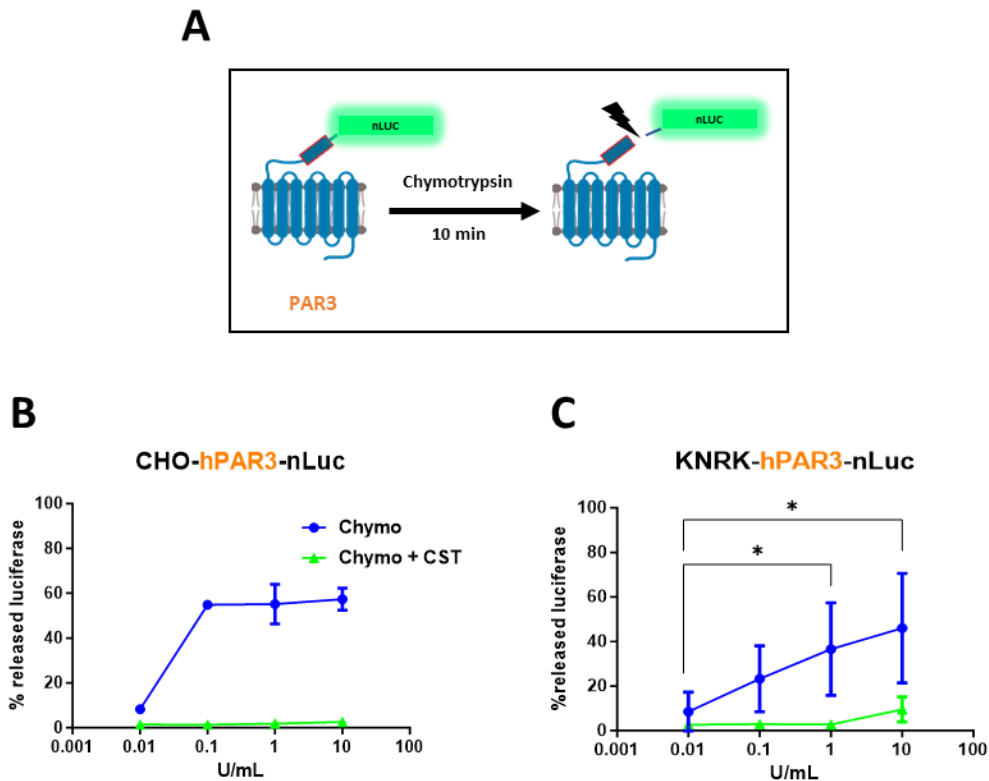


Figure 37: la chymotrypsine clive PAR3.

(A) Schéma représentatif du test de clivage réalisé à l'aide de la construction PAR3-Luciférase (nLUC : nanoLuciférase). (B-C) Quantification du clivage du domaine extracellulaire de PAR3. Des cellules CHO (B) ou KNRK (C) exprimant stablement la construction hPAR3-nLuc ont été incubées pendant 10 minutes avec différentes concentrations de chymotrypsine (Chymo) +/- chymostatine (CST). L'activité luciférase a été mesurée dans les surnageants et normalisée par rapport à l'activité luciférase totale présente dans des cellules non traitées. Les graphiques représentent la moyenne \pm SD du % d'activité luciférase libérée pour une concentration de chymotrypsine donnée. $n = 2-4$ expériences indépendantes pour les CHO et $n = 3-4$ pour les KNRK. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn).

Etude de la signalisation de la chymotrypsine en aval de PAR3

Ayant identifié la faculté de la chymotrypsine à cliver PAR3, nous avons étudié l'impact de ce clivage sur une potentielle signalisation intracellulaire. La capacité de PAR3 à induire une signalisation de manière autonome après clivage par une protéase est encore très débattue. L'une des seules études en faisant état rapporte une possible signalisation calcique et ERK1/2 via ce récepteur [395]. Dans le modèle hétérologue CHO-PAR3-nLuc, comme attendu, une stimulation cellulaire avec du sérum de veau fœtal (témoin positif) a entraîné une activation de la phosphorylation des kinases ERK1/2 (Figure 38). Toutefois, dans nos conditions expérimentales, le clivage de PAR3 par la chymotrypsine n'a pas induit d'activation de cette voie de signalisation (Figure 38).

PAR3 est décrit comme étant très exprimé par les neurones sensitifs des ganglions de la racine dorsale (DRG) [241], [286], comme l'illustre la RT-PCR réalisée à partir de DRG ou de cellules épithéliales murines CMT93 (Figure 39A). En outre, l'analyse quantitative du taux de transcrits des différents PARs présent dans les DRG a révélé que PAR3 est le récepteur le plus exprimé dans ce type cellulaire et que son expression est maintenue dans des neurones sensitifs mis en culture à partir des DRG (Figure 39B). Nous avons donc exploré la capacité de la chymotrypsine à activer une signalisation calcique dans ces cellules primaires. En témoin positif, nous avons stimulé les DRG avec de la thrombine, connue pour activer une signalisation calcique via PAR1 [284], [396]. Comme illustré par l'augmentation de fluorescence (F_{max}) des neurones, la thrombine induit bien une signalisation calcique dans les DRG (Figure 39C). Cependant, aucune signalisation calcique n'a été observée dans les neurones en culture en réponse à des doses croissantes de chymotrypsine.

Même si des analyses complémentaires devront être réalisées, nos résultats suggèrent que la chymotrypsine clive PAR3 sans engendrer de signalisation intracellulaire (calcium et ERK1/2).

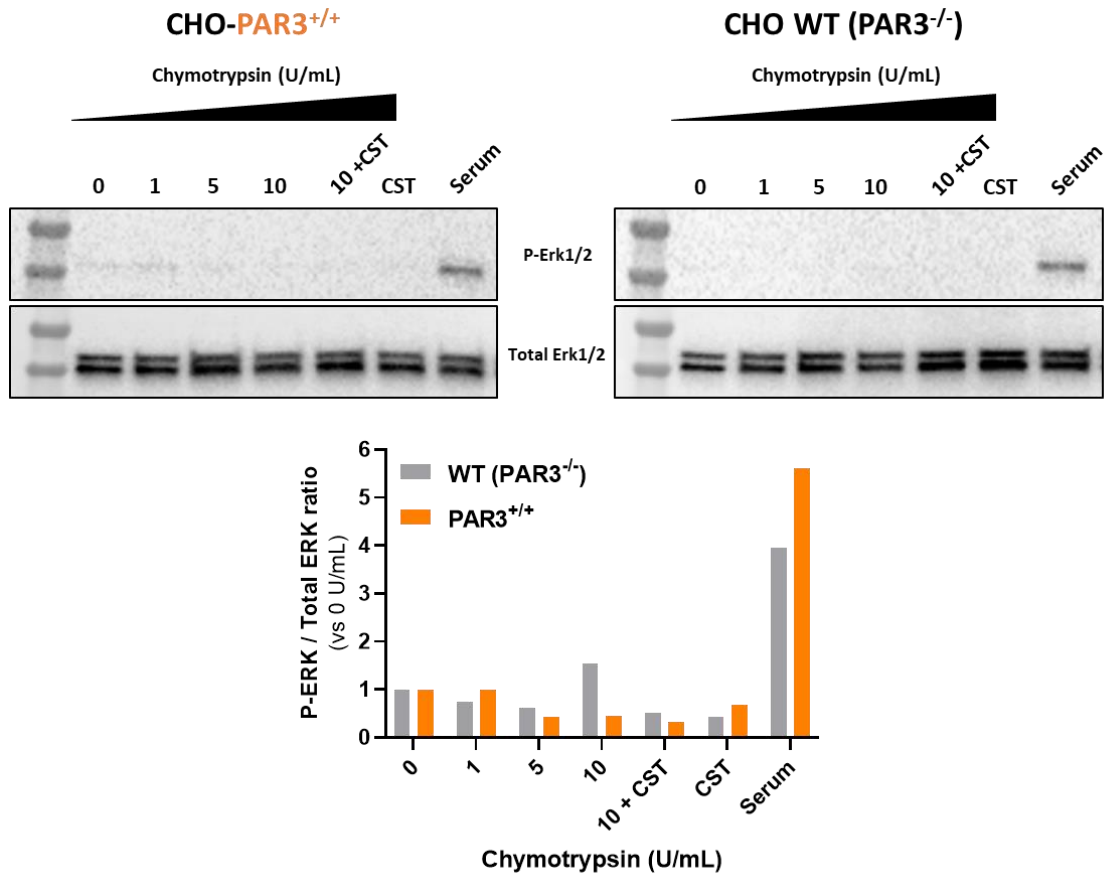


Figure 38: la chymotrypsine n'active pas la voie de signalisation ERK1/2 en aval de PAR3.

Immunodétection de la phosphorylation de ERK1/2 chez les CHO WT (n'exprimant pas PAR3) et PAR3^{+/+} (exprimant la construction hPAR3-nLuc). Les cellules ont été traitées pendant 10 min avec des concentrations croissantes de chymotrypsine (0 – 10 U/mL), en présence ou non de chymostatine à 500 µM (CST, un inhibiteur de chymotrypsine). Du sérum de veau fœtal (Serum) a été utilisé comme témoin positif. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot, en utilisant des anticorps anti-Phospho ERK1/2 (P-ERK) puis anti-ERK1/2 total. Les rapports entre les signaux P-ERK et ERK totales ont été quantifiés par analyse densitométrique et représentés sur le panel du bas. n= 1 expérience indépendante.

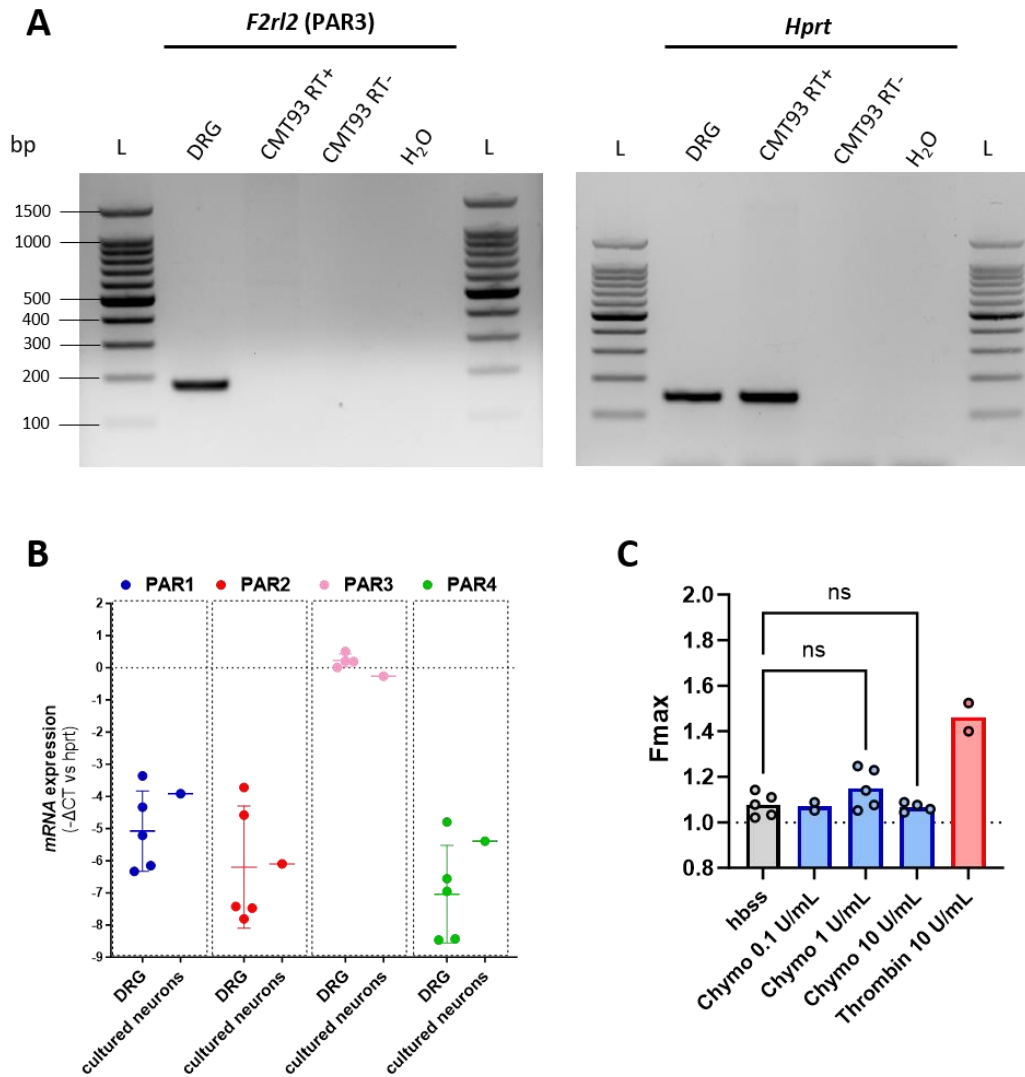


Figure 39: la chymotrypsine n'active pas de signalisation calcique dans des neurones sensitifs murins, exprimant fortement PAR3.

(A) Analyse de l'expression de l'ARNm *F2r12* (PAR3) dans les ganglions spinaux murins (DRG) et dans les cellules épithéliales intestinales CMT93 par PCR semi-quantitative. La transcription inverse des ARN en ADNc a été réalisée en présence (RT+) ou en l'absence (RT-) d'une enzyme transcriptase inverse. La PCR a été réalisée en utilisant des amorces pour amplifier *F2r12* et les amplicons ont été résolus sur un gel d'agarose à 1 %. L'ARNm de *Hprt* a été utilisé comme témoin de charge. (L : marqueur de taille). (B) Confirmation de l'expression de PAR3 et des autres PARs dans les neurones sensitifs en culture par PCR quantitative (RT-qPCR). Les résultats représentent l'expression relative des PARs dans les DRG avant et après culture, normalisée par rapport au gène de ménage *Hprt*. Chaque point représente un échantillon de DRG issu d'une souris. (C) Réponse calcique en réponse à la chymotrypsine (Chymo) dans des neurones murins en culture. Les neurones ont été isolés de DRG murins, placés 24h en culture puis marqués à l'aide d'une sonde fluo-8 avant d'être stimulés avec différentes concentrations de chymotrypsine ou son diluant (hbss). La thrombine a été utilisée comme témoin positif d'activation neuronale (diluant : hbss). La fluorescence maximale normalisée (Fmax) obtenue en réponse aux traitements a été quantifiée. Chaque point sur le graphique représente les neurones issus d'un individu. ns: non significatif (test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn).

Conclusion

L'activation des récepteurs PARs est l'un des mécanismes moléculaires par lequel les protéases régulent la physiologie intestinale. Ces récepteurs sont exprimés par un large éventail cellulaire dans l'intestin, y compris par les cellules épithéliales. Cependant, les acteurs de la signalisation protéolytique et leurs fonctions dans l'intestin sont loin d'avoir tous été caractérisés. Dans cette première partie nous nous sommes intéressés à la chymotrypsine, une protéase d'origine pancréatique, bien connue pour ses implications dans la digestion des aliments. En revanche, la fonction de cette enzyme dans l'homéostasie intestinale et sa capacité à interagir avec les PARs restaient méconnues.

D'anciennes études avaient suggéré que la chymotrypsine pourrait être retrouvée au contact de la muqueuse de l'intestin grêle. Dans des échantillons murins et humains, nous avons pu détecter la présence de chymotrypsine active dans le colon et ce, y compris à proximité de la muqueuse. Ceci renforce la possibilité d'interactions entre la chymotrypsine et les cellules épithéliales intestinales. Par des approches pharmacologiques, nous avons mis en évidence que cette enzyme était capable de cliver les récepteurs PAR1 et PAR2, tous deux exprimés par les cellules épithéliales intestinales, ainsi que PAR3 qui est exprimé par les neurones sensitifs.

Dans des lignées cellulaires épithéliales, nous avons montré que le clivage de PAR1 par la chymotrypsine désarmait très efficacement ce récepteur, prévenant ainsi son activation par son agoniste canonique, la thrombine. A l'inverse, le clivage de PAR2 active une signalisation intracellulaire via l'engagement de la voie calcique et MAPK. Les mécanismes moléculaires de clivage de ces récepteurs par la chymotrypsine ainsi que des voies signalisations déclenchées ont ensuite été décryptés.

En ce qui concerne PAR3, son clivage par la chymotrypsine ne semble pas activer de signalisation ERK1/2 dans des cellules CHO, ni de signalisation calcique dans des neurones sensitifs. Il semble donc que le clivage de PAR3 par la chymotrypsine ne soit pas activateur d'une signalisation intracellulaire. Ces résultats devront être confirmés et complétés par des approches de spectrométrie de masse pour identifier le site de clivage de la chymotrypsine sur PAR3. En revanche, la non-fonctionnalité de la construction PAR4- ne nous a pas permis de conclure quant à un potentiel clivage de ce récepteur par la

chymotrypsine. Le développement d'une nouvelle construction sera donc nécessaire pour adresser cette question.

Au-delà de son rôle digestif, ces résultats mettent en lumière de nouveaux rôles potentiels de la chymotrypsine pouvant agir comme un véritable régulateur de la signalisation protéolytique dans l'intestin. Ces travaux questionnent donc sur les possibles effets fonctionnels de l'interaction chymotrypsine-épithélium intestinal qui seront adressés dans la deuxième partie des résultats de cette thèse.

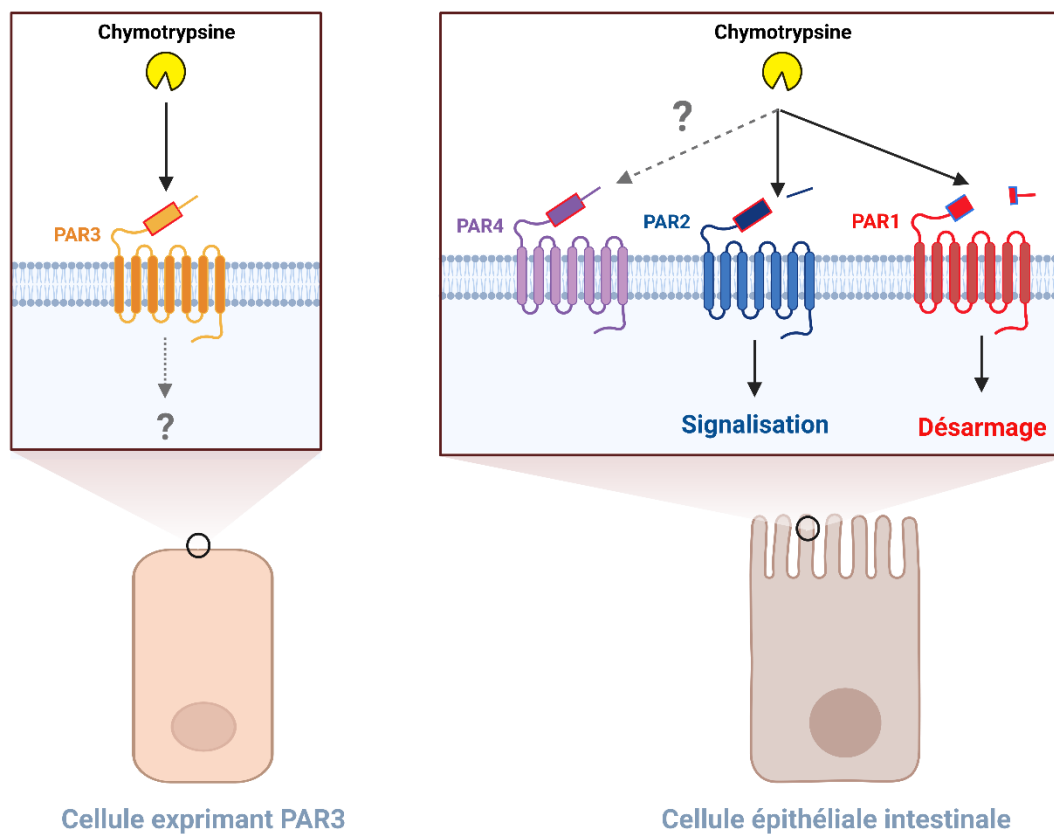


Figure 40: schéma récapitulatif de l'étude des interactions entre la chymotrypsine et les PARs.

Figure créée avec Biorender.com.

Partie 2 : Caractérisation des effets biologiques de la chymotrypsine sur l'épithélium intestinal

Introduction

Au cours de l'étude précédente (partie 1), nous avons identifié la chymotrypsine comme étant retrouvée à proximité de la muqueuse intestinale et capable de moduler des médiateurs signalétiques des cellules épithéliales intestinales via le clivage des PARs. Les protéases ayant été associées à des effets aussi bien bénéfiques que délétères vis-à-vis de l'épithélium intestinal, nous avons souhaité explorer les conséquences cellulaires de l'interaction entre la chymotrypsine et les cellules épithéliales intestinales.

Le modèle organoïde permet de reproduire *in vitro* un épithélium mature et fonctionnel en trois dimensions à partir de cellules progénitrices intestinales ou de cryptes isolées [180]. Il permet ainsi d'évaluer la capacité de prolifération, de renouvellement et de différenciation des cellules épithéliales dans des conditions données.

En utilisant ce modèle de culture cellulaire, nous avons voulu identifier si des fonctions clés de l'épithélium intestinal pouvaient être affectées par la chymotrypsine. Nous avons donc suivi l'impact de traitements à la chymotrypsine sur la croissance, la morphologie et l'expression de marqueurs clés des fonctions épithéliales dans des cultures d'organoïdes coliques humains. De plus, ayant identifié la capacité de la chymotrypsine à activer PAR2, nous avons aussi exploré le rôle de ce récepteur dans les effets observés à l'aide d'un antagoniste pharmacologique.

Résultats

La chymotrypsine n'impacte pas la croissance et la morphologie des organoïdes intestinaux humains

Afin de caractériser l'impact de la chymotrypsine sur les capacités de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales, nous avons établi des cultures d'organoïdes coliques humains à partir de tissus sains prélevés sur des patients atteints d'un cancer colorectal. Des cryptes coliques isolées pour chaque patient ont été mises en culture pendant 10 jours dans une matrice tridimensionnelle formée de matrigel. A partir du 4^{ème} jour de culture, les organoïdes néoformés ont été traités tous les deux jours jusqu'au 10^{ème} jour avec des doses croissantes de chymotrypsine (ou son diluant) pour mimer une exposition chronique de l'épithélium à cette enzyme (Figure 41A). Les concentrations utilisées (0,05 et 0,5 U/mL) ont été choisies de manière à éviter la dégradation du matrigel étant intervenue à des concentrations plus élevées de chymotrypsine (au-delà de 1 U/mL), lors d'expériences de mise au point (non montré).

En utilisant une approche de microscopie haut-débit, nous avons d'abord étudié les effets de la chymotrypsine sur le nombre, la taille et la morphologie des organoïdes qui sont des indicateurs de l'état de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales. En effet, comme schématisé en Figure 41A, les cellules prolifératives contenues dans les cryptes coliques forment des organoïdes en quelques jours, une fois placées en culture. Ce sont initialement des structures sphériques immatures et très prolifératives, composées d'une fine monocouche cellulaire. Au fil des jours, ces structures immatures prolifèrent rapidement puis commencent à se différencier en s'invaginant, formant finalement des structures matures irrégulières, ornées de pseudo-cryptes. En accord avec ce profil évolutif, le suivi morphologique a montré une augmentation de la taille des organoïdes au fil des jours de culture, associée à une diminution de leur circularité (Figure 41C, D). Le nombre d'organoïdes diminuait entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour de culture, mais était relativement stable par la suite (Figure 41B). Cependant, en comparaison à la condition contrôle, aucun de ces paramètres morphologiques n'a été significativement impacté par la chymotrypsine.

La chymotrypsine n'a donc pas modifié significativement la croissance, ni la morphologie des organoïdes en culture.

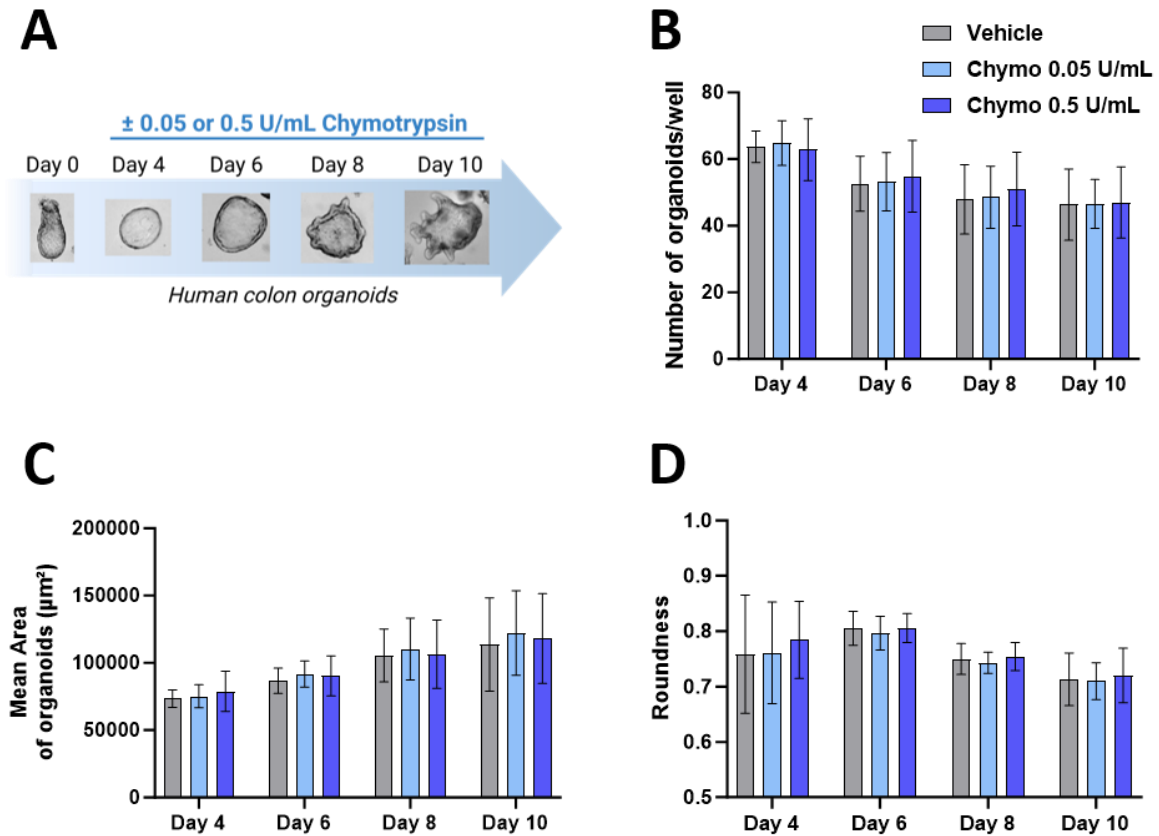


Figure 41: la chymotrypsine n'impacte pas la morphologie des organoïdes en culture.

(A) Schéma représentatif du protocole de traitement chronique des organoïdes. Des cryptes ont été isolées de tissus coliques humains et placées en culture pendant 10 jours dans un milieu permettant la formation d'organoïdes. Les cultures ont été traitées lors du changement de milieu aux jours 4, 6 et 8 avec de la chymotrypsine (0,05 et 0,5 U/mL) ou son diluant (HBSS). Le traitement a été maintenu au contact des cellules jusqu'au 10^{ème} jour de culture. (B-D) Quantification des paramètres morphologiques des organoïdes à chaque jour de traitement par la chymotrypsine ou son diluant. Le nombre d'organoïdes par puits (B), leur aire moyenne en μm^2 (C), ainsi que leur indice de circularité (roundness) (D) ont été mesurés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n=3$ patients différents, avec au moins 300 organoïdes comptés par patient au total). Résultats analysés pour chaque jour de culture avec le test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn, non significatifs.

La chymotrypsine modifie l'expression de gènes clés pour le maintien des fonctions épithéliales

Pour caractériser plus finement les effets de cette enzyme sur l'épithélium intestinal nous avons aussi étudié le profil transcriptionnel d'organoïdes exposés ou non à la chymotrypsine. Pour cela, l'expression de plus de 40 gènes impliqués dans plusieurs fonctions clés de l'épithélium, ainsi que des marqueurs des différentes populations cellulaires épithéliales a été quantifiée par RT-qPCR.

Les résultats obtenus pour les deux concentrations de chymotrypsine utilisées ont été résumés et comparés à la condition contrôle grâce à une analyse en composante principale (ACP) (Figure 42 A, B). L'ACP permet de récapituler un jeu de données dans un espace en deux dimensions au sein duquel la distance entre deux échantillons reflète leur niveau de similarité par rapport à l'ensemble des gènes analysés (plus la distance entre deux groupes est grande plus ils sont différents). D'après cette analyse, la plus faible concentration de chymotrypsine utilisée (0,05 U/mL) n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression des gènes étudiés (Figure 42A). Ceci se manifeste par un chevauchement dans l'espace des organoïdes contrôles et traités. En revanche, à l'exception d'un échantillon, la chymotrypsine à 0,5 U/mL a fortement modifié le profil transcriptionnel des organoïdes (Figure 42B). Ainsi, sur plus de 40 gènes analysés, 22 ont été retrouvés significativement différentiellement exprimés à cette concentration par rapport au contrôle. La Figure 42 C illustre le niveau d'expression des gènes différentiellement exprimés, regroupés par fonction. Les tendances observées pour la totalité du panel de gènes analysés sont regroupées en Figure Supp. 1.

Parmi les facteurs les plus différentiellement exprimés, une forte surexpression de marqueurs de cellules différenciées a été observée lors des traitements à la chymotrypsine (Figure 42C, Figure Supp. 1A). Par exemple, l'expression de *MUC2* et *TFF3* (*Trefoil factor 3*), deux marqueurs de cellules caliciformes, a été fortement augmentée. Le gène de la *chromogranine A* (*CHGA*, un marqueur des cellules entéro-endocrines a aussi été surexprimé en présence de chymotrypsine. Ceci est associé à une expression à la hausse du facteur de transcription *CDx2*, connu pour promouvoir la différenciation des cellules caliciformes et entérocytaires [397], mais aussi de *SLC26A3*, codant un transporteur ionique associé à la

maturation de l'épithélium [398]. La chymotrypsine semble donc favoriser l'expression de facteurs de différenciation sécrétoire dans les organoïdes.

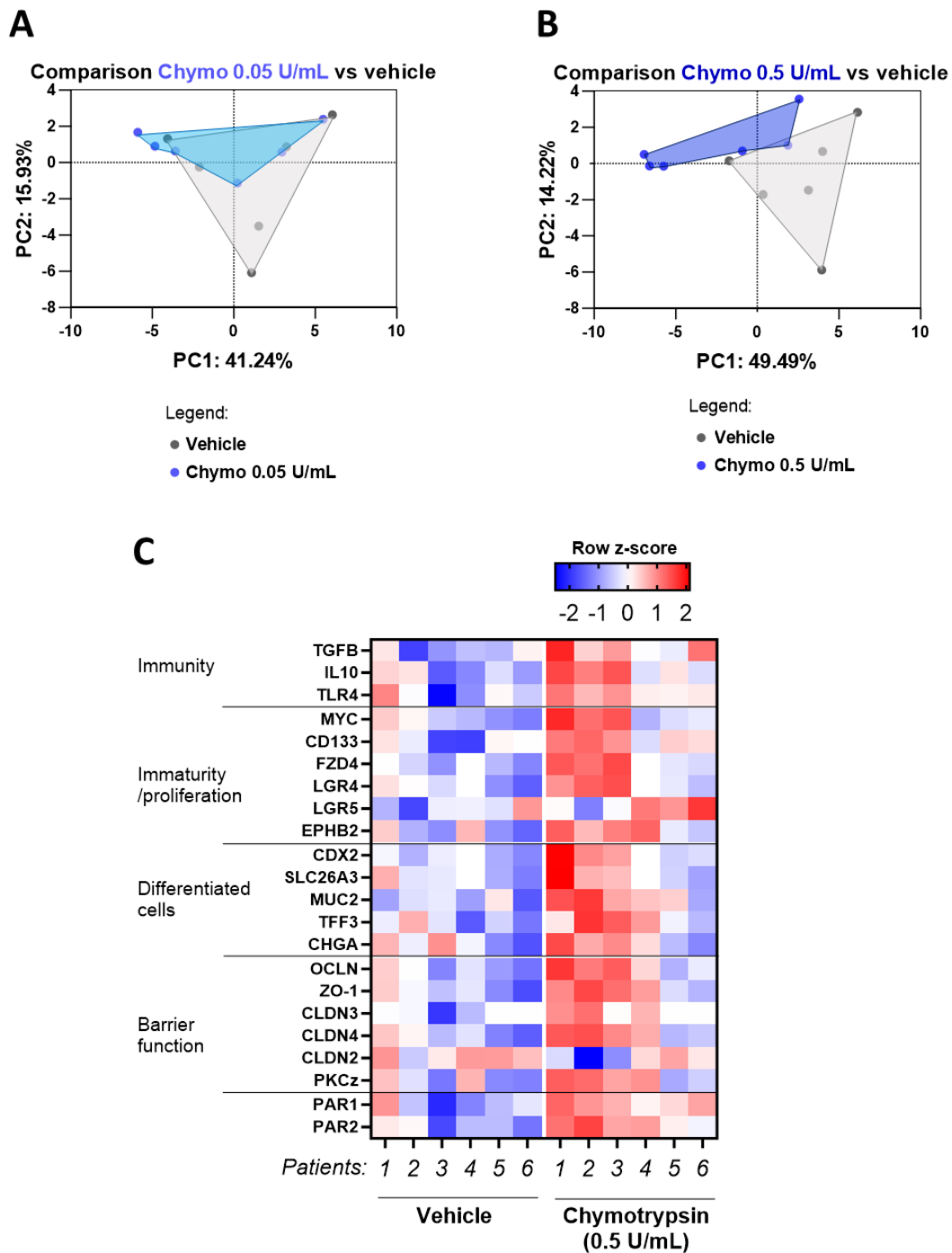


Figure 42: la chymotrypsine modifie le profil d'expression génique des organoïdes.

(A-B) Analyse en Composante Principale du profil transcriptionnel des organoïdes traités avec de la chymotrypsine à 0,05 ou 0,5 U/mL en comparaison à son diluant (vehicle). Les organoïdes ont été cultivés en présence ou non de chymotrypsine entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour de culture. L'analyse a combiné les niveaux d'expression de plus de 40 gènes quantifiés par RT-qPCR. Chaque point sur le graphique représente le profil obtenu pour les organoïdes issus d'un patient (n=6 patients). (B) Représentation en Heatmap du niveau d'expression des gènes statistiquement différenciellement

exprimés entre la condition chymotrypsine à 0,5 U/mL et la condition contrôle (vehicule). L'analyse d'expression différentielle a été réalisée par le test de Friedman suivi du test post-hoc de Dunn pour chaque gène, à partir des valeurs d'expressions relatives $-\Delta\text{Ct}$ (incluant la comparaison avec le traitement à 0,05 U/mL qui n'a pas été représenté). Les gènes sont classés à titre indicatif selon leur fonction rapportée dans la littérature (classification non exhaustive).

De façon intéressante, une augmentation concomitante de certains marqueurs de cellules souches et progénitrices dont *LGR5*, *LGR4*, *FZD4*, *EPHB2* et *CD133* a aussi été retrouvée. Ceci pourrait suggérer la mise en place de mécanismes complexes alliant activation de voies importantes pour le renouvellement des cellules immatures et en même temps des voies de différenciation.

Nous avons aussi quantifié l'expression génique de protéines de jonctions serrées, responsables de la fonction barrière de l'épithélium (Figure 42C, Figure Supp. 1B). L'exposition à la chymotrypsine a induit une surexpression de l'ARNm des facteurs pro-barrières telle que l'occludine (*OCLN*) et les claudines 3 et 4 (*CLDN3*, *CLDN4*). A l'inverse, une diminution de l'expression de la claudine 2 (*CLDN2*), associée à la formation de pores dans les jonctions serrées, a été observée [399]. Ces éléments tendent vers un effet pro-barrière potentiel de la chymotrypsine dans nos conditions.

Connaissant l'implication de certaines protéases et de PAR2 dans l'induction des voies pro-inflammatoires nous avons mesuré l'expression d'un certain nombre de médiateurs immunitaires produits par l'épithélium colique. Curieusement, l'expression de gènes codant des médiateurs anti-inflammatoires promouvant la tolérance immunitaire comme l'*IL10* ou le *TGFB* (Transforming Growth Factor beta) a été significativement augmentée par la chymotrypsine, alors que celle de cytokines pro-inflammatoires comme *CXCL8*, *IL1b*, ou le *TNF* est restée inchangée (Figure 42C, Figure Supp. 1C). L'ARNm de TLR4, un récepteur de l'immunité innée reconnaissant des antigènes bactériens a aussi été significativement augmenté lors des traitements à la chymotrypsine. En outre, l'expression de marqueurs de stress cellulaires n'ont pas été pas modulés par cette enzyme en comparaison à la condition contrôle (Figure Supp. 1D).

Fait intéressant, PAR1 et de PAR2 étaient légèrement surexprimés en réponse à la chymotrypsine. Une augmentation de l'expression des PARs en réponse à leurs agonistes a

déjà été rapportée dans le modèle organoïde et pourrait être un signe indirect de leur clivage [294].

Ces résultats montrent donc que la chymotrypsine à 0,5 U/mL module l'expression transcriptionnelle de nombreux gènes chez les organoïdes coliques humains. Dans leur globalité, l'augmentation concomitante de l'expression des marqueurs anti-inflammatoires et pro-barrières suggèrent que cette enzyme promeut un profil transcriptionnel protecteur pour les cellules épithéliales. Cette observation est renforcée par la surexpression de marqueurs sécrétoires (*MUC2*, *TFF3*, *SLC26A3*), qui sont importants pour la protection de la muqueuse intestinale.

Etude de l'implication de PAR2 dans les effets transcriptionnels de la chymotrypsine

Ayant identifié la chymotrypsine comme un activateur de PAR2 à la surface de lignées cellulaires épithéliales, nous avons questionné la possible implication de ce récepteur dans les effets transcriptionnels observés dans les organoïdes. Pour cela nous avons répété les expériences précédentes à partir d'organoïdes issus de trois nouveaux patients et combiné les traitements à la chymotrypsine avec un antagoniste pharmacologique de PAR2, le I-191. Cet antagoniste ou son diluant (DMSO 0,05%) ont été pré-incubés avec les organoïdes pendant 45 minutes avant l'ajout de chymotrypsine et sa présence a été maintenue tout au long de la phase de traitement des organoïdes (Figure 43A).

Nous avons dans un premier temps vérifié l'absence d'influence de cet antagoniste sur la croissance et la maturation des organoïdes. Comme lors des expériences précédentes, la chymotrypsine n'a impacté aucun des paramètres de suivi morphologique des organoïdes comparé à la condition contrôle (Figure 43B-D). De plus, aucun effet significatif de l'antagoniste de PAR2 n'a été observé (Figure 43B-D). Comme précédemment, une analyse d'expression génique a aussi été réalisée sur ces échantillons. Cependant, la plupart des effets transcriptionnels préalablement observés avec la chymotrypsine à 0,5 U/mL n'a pas pu être confirmée lors de ces nouvelles expériences. Ces divergences n'ont pas été causées par la présence du diluant du I-191 car il n'a eu aucun effet sur le niveau d'expression basal des gènes analysés (non montré). Nous avons tout de même pu confirmer que la chymotrypsine

induit une augmentation de l'expression de l'*IL10*, *MUC2* (non significative pour ce gène), *CHGA* et *LGR5* comparé au témoin (Figure 43E). Le I-191 n'a eu cependant aucun impact sur la surexpression de *MUC2*, la *CHGA* et *LGR5* en réponse à la chymotrypsine, montrant que ces effets ne sont pas dépendants de PAR2. De manière intéressante, comparé au niveau d'expression obtenu avec la chymotrypsine seule, l'ajout de I-191 tendait à diminuer l'expression de l'*IL10*. Cette différence n'était pas significative, mais est nettement observable et suggère fortement un effet dépendant de PAR2.

Ces expériences nous ont donc permis de confirmer que la chymotrypsine induisait une augmentation de l'expression de *MUC2*, *CHGA* et *LGR5* dans des organoïdes coliques humains. Ces effets ne sont cependant pas médiés par une activation du récepteur PAR2. En revanche, PAR2 pourrait être impliqué dans la surexpression d'*IL10* en réponse à la chymotrypsine, mais ces résultats devront être confirmés par des expériences supplémentaires pour statuer définitivement sur son implication.

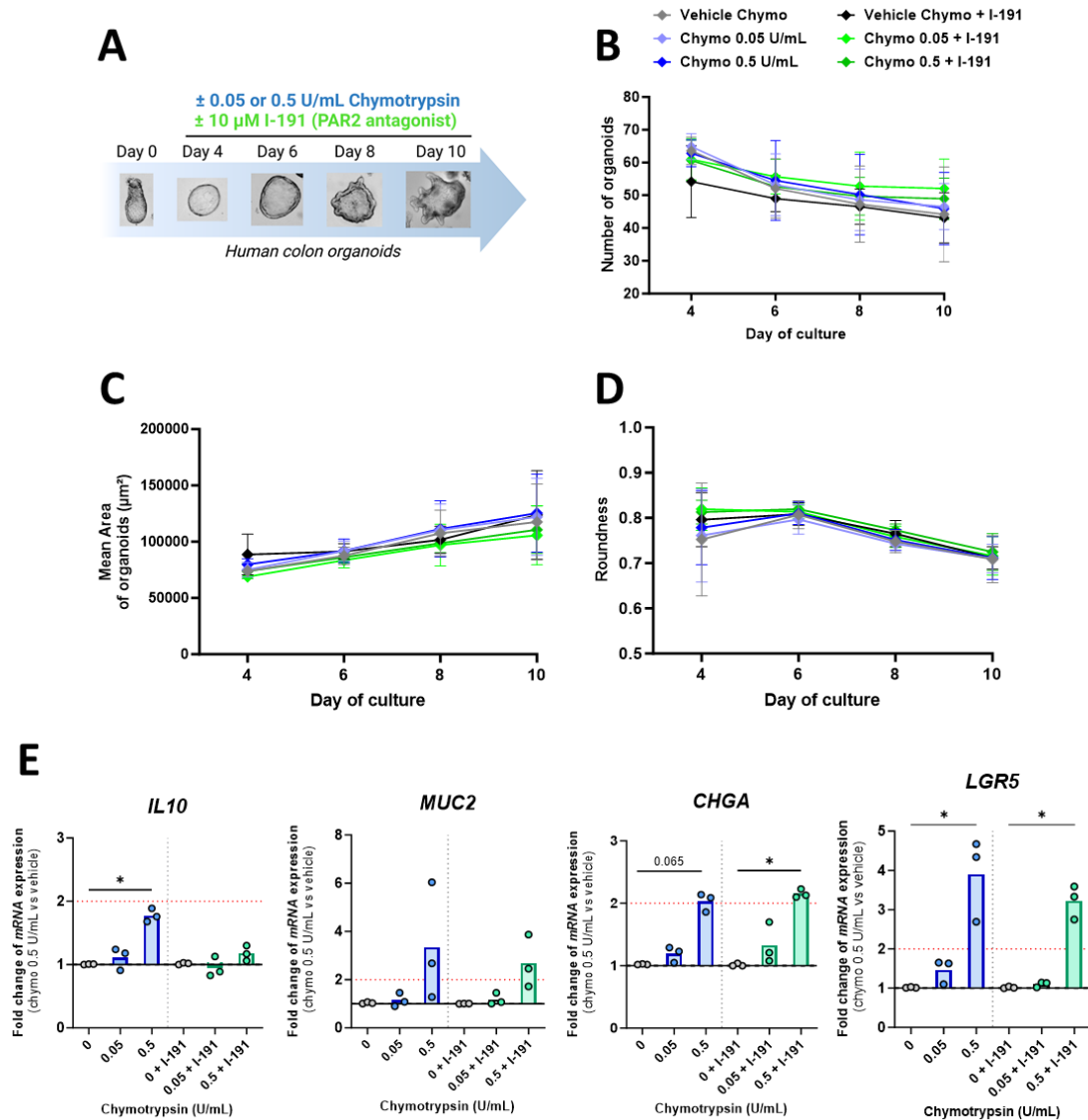


Figure 43: PAR2 semble impliqué dans la surexpression de l'IL10 en réponse à la chymotrypsine.

(A) Schéma représentatif du protocole de traitement chronique des organoïdes avec de la chymotrypsine et un antagoniste de PAR2. Des cryptes ont été isolées de tissus coliques humains et placées en culture pendant 10 jours, dans un milieu permettant la formation d'organoïdes. Aux jours 4, 6, et 8 le milieu de culture des organoïdes a été additionné de I-191 à 10 µM ou son diluant (DMSO 0,05%). Après 45 min de pré-incubation, de la chymotrypsine à 0,05 et 0,5 U/mL ou son diluant (HBSS) ont été ajoutées au milieu de culture. Les cultures ont été traitées lors du changement de milieu aux jours 4, 6 et 8 avec de la chymotrypsine (0,05 et 0,5 U/mL) ou son diluant (HBSS). Ces traitements ont été maintenus au contact des cellules jusqu'au 10^{ème} jour de culture. (B-D) Quantification des paramètres morphologiques des organoïdes à chaque jour de traitement avec la chymotrypsine ou son contrôle, en présence ou non de I-191. Le nombre d'organoïdes par puits (B), leur aire moyenne en µm² (C), ainsi que leur indice de circularité (roundness) (D) ont été mesurés. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3 patients différents, avec au moins 300 organoïdes comptés par patient au total). Résultats analysés pour chaque jour de culture avec le test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn, non significatifs. (E) Mesure de l'expression par RT-qPCR des gènes *IL10*, *MUC2*, *CHGA* et *LGR5*. Les résultats sont exprimés en rapport d'expression (Fold Change) par rapport à la condition contrôle. Chaque point représente un patient. *p<0.05; **p<0.01 (test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn).

Discussion et conclusion

Les rôles de la chymotrypsine dans l'homéostasie intestinale restent méconnus. Au cours de cette étude, nous avons voulu identifier quels pouvaient être les effets biologiques de cette protéase sur l'épithélium intestinal. Pour cela, il nous a semblé opportun d'utiliser le modèle organoïde qui permet de récapituler la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal en trois dimensions, à partir de cellules souches intestinales humaines.

Nous avons montré que l'exposition chronique à des doses contrôlées de chymotrypsine n'avait pas d'effet sur la croissance ni la morphologie d'organoïdes coliques humains. Cela pourrait suggérer qu'à ces concentrations, cette enzyme n'impacte pas significativement la prolifération et la maturation des cellules souches et des progéniteurs intestinaux. Cependant, les paramètres mesurés se sont principalement concentrés sur le suivi de la taille et de la circularité des organoïdes. Par la suite, des analyses d'images plus poussées pourraient être réalisées afin de définir plus finement l'état de différenciation des cultures traitées ou non à la chymotrypsine. En effet, un autre indicateur de différenciation des organoïdes est l'état de polarisation des cellules qui les composent, qui se manifeste par un épaissement de la monocouche épithéliale [294], [400]. La proportion de structures polarisées ou non au sein d'une culture pourrait donc être un paramètre intéressant à quantifier par microscopie haut-débit (en champs clair) pour caractériser finement nos cultures. Les principales populations cellulaires épithéliales (progénitrices et différenciées) pourront aussi être quantifiées via des immunomarquages.

Même si la morphologie des organoïdes n'était pas modifiée, la chymotrypsine s'avère capable de réguler l'expression génique des cellules épithéliales coliques. Les résultats des différentes expériences menées au cours de cette partie se sont toutefois avérés difficilement reproductibles. Dans un premier temps, nous avons observé que la chymotrypsine à 0,5 U/mL induisait un profil transcriptionnel protecteur chez les organoïdes en augmentant l'expression d'une vingtaine de gènes dont des marqueurs anti-inflammatoires et pro-barrières, ainsi que des marqueurs de différenciation épithéliale et de cellules immatures. Cependant, une deuxième série d'expériences nous a uniquement permis de confirmer la surexpression des facteurs *CHGA*, *MUC2*, *LGR5* et *IL10* en réponse à la chymotrypsine chez les organoïdes.

Plusieurs éléments pourraient expliquer ces divergences. Tout d'abord, l'utilisation de ce type de culture primaire est très intéressante car elle permet de conserver au mieux les caractéristiques du tissu épithélial humain, mais les particularités physiologiques propres à chaque individu peuvent aussi apporter de l'hétérogénéité aux résultats. De plus, nos primocultures ont été générées à partir de zones tissulaires saines mais prélevées chez des patients atteints de cancers colorectaux. Ainsi, les différences observées pourraient être le fruit de microenvironnements tissulaires plus ou moins modifiés entre les patients et dont les CSI garderaient l'empreinte une fois placées en culture. Enfin, la culture d'organoïdes est basée sur l'utilisation de réactifs d'origine biologique comme le matrigel ou le milieu conditionné WENR, dont les compositions peuvent varier d'un lot à l'autre, pouvant apporter des microdifférences dans les conditions de culture et influencer la réponse des organoïdes aux traitements. Ces bioréactifs peuvent aussi contenir des modulateurs de l'activité protéasique. Malgré ses nombreux avantages, ces éléments mettent en exergue la complexité de l'utilisation de ce modèle à partir de tissus humains.

Les résultats obtenus sont tout de même d'un grand intérêt car les gènes identifiés codent des facteurs clés de certaines populations cellulaires épithéliales. Le récepteur membranaire LGR5 potentialise la voie Wnt/ β -caténine, indispensable à l'auto-renouvellement des CSI et est un marqueur de cette population [20]. Le gène *CHGA* encode la chromogranine A, une protéine impliquée dans la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs par les cellules entéro-endocrine du tractus digestif [401]. La mucine 2 (*MUC2*), sécrétée par les cellules caliciformes, est quant à elle la protéine structurante majoritaire du mucus intestinal. Des analyses au niveau protéique seront nécessaires pour évaluer si les effets observés résultent d'un enrichissement en ces populations cellulaires ou alors uniquement d'une expression plus forte de ces facteurs par un même nombre de cellules. Enfin, l'interleukine-10 (*IL10*) est une cytokine largement considérée comme ayant des effets anti-inflammatoires et qui favorise la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales, suggérant un effet protecteur de la chymotrypsine [402].

Nos données montrent que les effets transcriptionnels observés pour *MUC2*, *CHGA*, et *LGR5* ne sont pas médiés par l'activation de PAR2, car l'utilisation d'un antagoniste de ce récepteur ne diminuait pas significativement l'effet de la chymotrypsine. En revanche, la surexpression de *IL10* tendait à être diminuée en présence de l'antagoniste de PAR2,

suggérant que ce récepteur est impliqué dans l'effet de la chymotrypsine. Des analyses complémentaires sur un panel de patients plus important devront être réalisées afin de confirmer ces résultats.

Il convient de signaler que le modèle organoïdes présente certaines limites pour notre étude. En effet, la chymotrypsine est une protéase luminale. Les organoïdes sont des structures closes, formant une lumière centrale qui ne permet pas d'accéder au pôle apical des cellules épithéliales. Dans notre cas nous avons ajouté la chymotrypsine dans le milieu de culture des organoïdes, exposant donc le pôle basolatéral des cellules à cette enzyme. Même si le récepteur étudié ici (PAR2) est décrit comme étant exprimé aux deux pôles des cellules épithéliales [288], les effets observés pourraient donc ne pas refléter complètement les réponses cellulaires induites par la chymotrypsine *in vivo*. A l'avenir il serait donc nécessaire de poursuivre cette étude en utilisant des modèles *in vivo* ou *in vitro* permettant un accès au pôle apical de l'épithélium (administration intra-colique chez la souris, cultures primaires en 2D sur inserts semi-perméables). En outre, des problèmes de dégradation du matrigel à des concentrations plus hautes de chymotrypsine nous ont contraint à utiliser des doses relativement faibles de chymotrypsine. Concentrations auxquelles l'activation de PAR2 est difficile à détecter dans les CMT93 (voir publication Guignard *et al.*, section résultats, partie 1), ce qui pourrait être un frein à l'identification de cibles régulées par la chymotrypsine via ce récepteur et renforce l'intérêt de modèles alternatifs.

En conclusion, cette étude a montré que la chymotrypsine était capable de réguler l'expression génique des cellules épithéliales coliques en favorisant l'expression du marqueur de cellules souches *LGR5*, de cellules caliciformes *MUC2* et de cellules entéro-endocrine *CHGA* de manière indépendante de PAR2. L'implication de ce récepteur dans la surexpression d'*IL10* en réponse à la chymotrypsine reste cependant à confirmer.

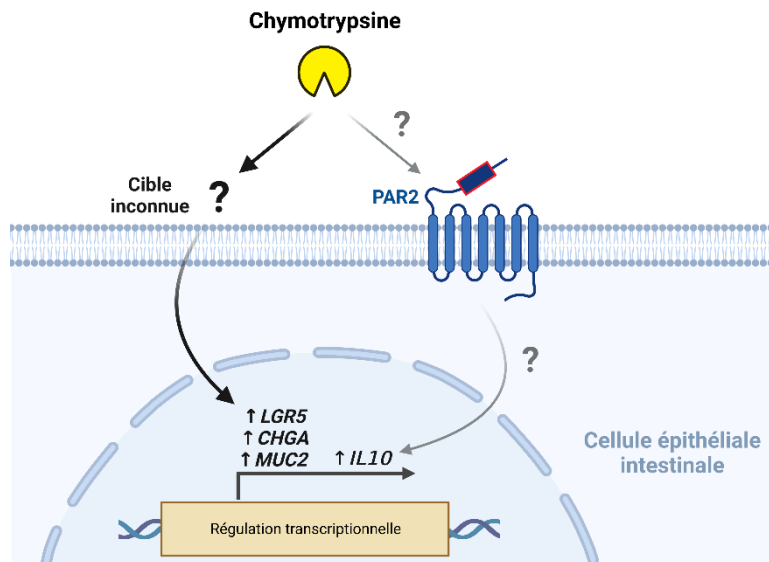


Figure 44: schéma récapitulatif des résultats de la caractérisation des effets biologiques de la chymotrypsine sur les organoïdes intestinaux humains.

Figure créée avec Biorender.com.

Figures supplémentaires

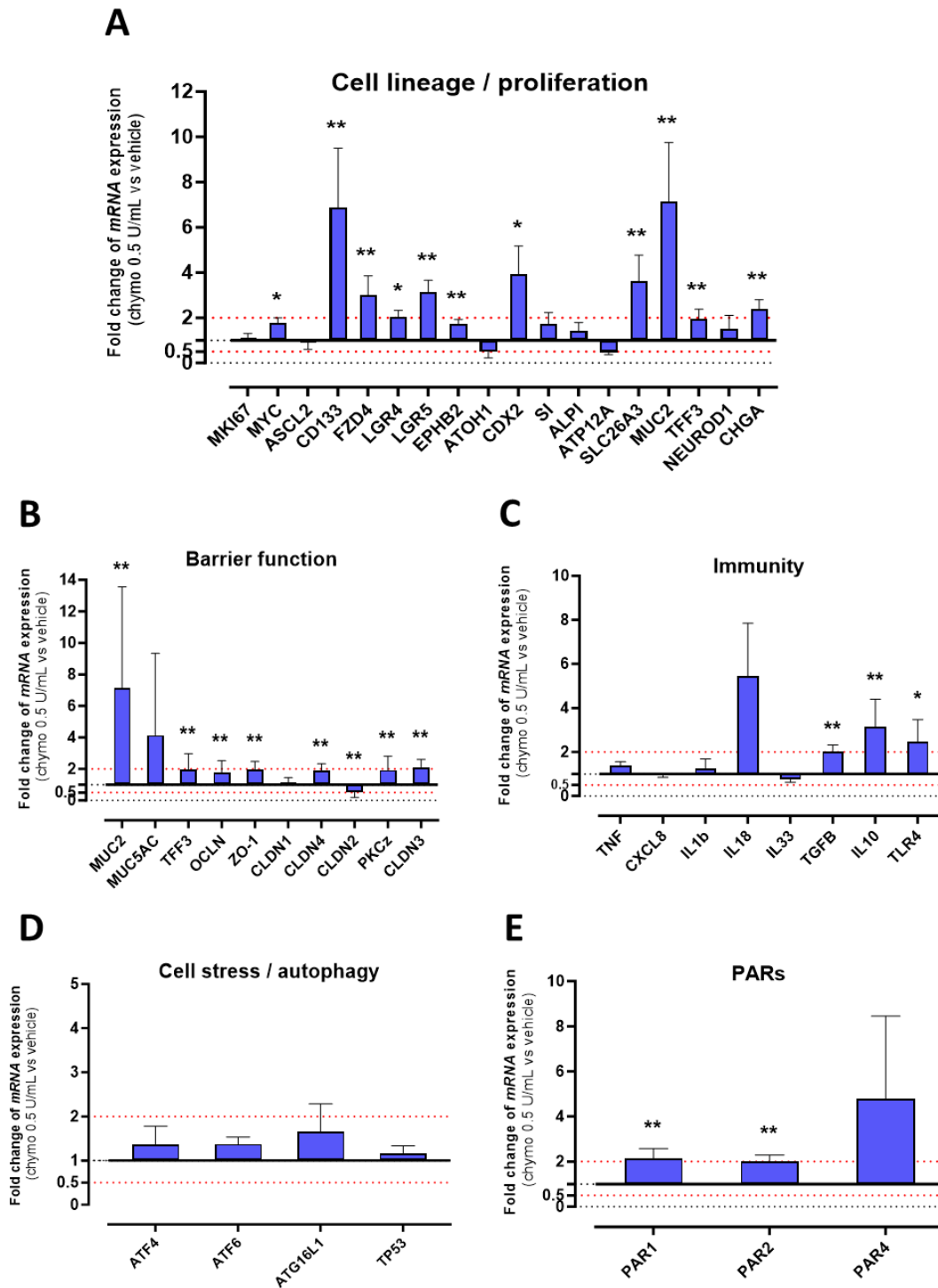


Figure Supp. 1 : Effet de la chymotrypsine sur le profil transcriptionnel des organoïdes.

(A-E) Expression transcriptionnelle de l'ensemble des gènes analysés par RT-qPCR chez les organoïdes traités avec 0,5 U/mL de chymotrypsine comparé à la condition véhicule. Pour chaque gène, la valeur d'expression de la condition véhicule a été fixée à 1. Chaque histogramme représente le rapport d'expression (Fold Change) du gène chez les organoïdes traités avec 0,5 U/mL de chymotrypsine par rapport à la condition contrôle (diluant : vehicle). Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n=6 patients différents). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test de Friedman suivi du test de comparaison multiple de Dunn, incluant la comparaison avec le traitement à 0,05 U/mL).

Partie 3 : Régulation de l'activité chymotrypsique fécale chez les patients atteints de MICI

Introduction

Dans les études précédentes nous avons principalement centré notre attention sur les fonctions de la chymotrypsine vis-à-vis de l'épithélium intestinal en condition physiologique. Cependant, une dérégulation de nombreuses activités protéolytiques est retrouvée dans diverses conditions pathologiques, incluant les MICI [316], [403]. De façon générale, une augmentation d'activité protéolytique globale est retrouvée au niveau fécal chez les individus souffrant de ce type de pathologie [315]. A l'état physiologique, les activités chymotrypsiques sont aisément détectables au niveau fécal [376], mais la littérature demeure néanmoins parcellaire quant à la régulation de ce type d'activité dans les fèces de patients atteints de MICI.

Dans ce cadre, nous avons souhaité explorer la régulation de la chymotrypsine au niveau fécal dans le contexte des MICI. **Pour cela, nous avons dosé l'activité chymotrypsique fécale dans une cohorte de donneurs sains et de patients atteints de MICI. A partir de nos résultats et des données cliniques des patients, notre objectif était d'évaluer si le taux de chymotrypsine fécale pouvait être associé au statut inflammatoire ou de rémission des MICI.**

Résultats

L'activité chymotrypsique fécale est augmentée chez les patients atteints de MICI

Dans le cadre d'une collaboration avec les Hôpitaux de Toulouse notre équipe a constitué une bio-collection de selles humaines issues de donneurs sains (contrôles) et de patients atteints de MICI en phase de poussée inflammatoire (active) ou en rémission. Près de 59 sujets ont été inclus dans cette bio-banque, le Tableau 8 résume les caractéristiques générales des patients de cette cohorte. L'âge des sujets ne différait pas significativement entre les individus contrôles et MICI et une plus grande proportion de femmes a été observée dans ces deux groupes. Au sein du groupe MICI, les patients souffraient très majoritairement d'une MC.

Tableau 8: données cliniques des patients composant la cohorte de selles humaines.

	Donneurs sains	MICI		
Nombre de patients	19	40		
Age (\pm SD)	38,3 (15,9)	42,4 (13,3)		
Femme/Homme	14/5	25/15		
Pathologie		MC	RCH	MICI non identifiée*
Nombre de patients		29	8	3
Dont maladie active		10		
Rémission		25		

*Diagnostic exact non établi au moment du prélèvement.

Nous avons utilisé les échantillons de cette bio-banque afin de doser les activités de type chymotrypsine au niveau fécal. Pour cela, des surnageants fécaux ont été préparés par broyage des matières fécales dans un tampon permettant de conserver l'activité des enzymes chymotrypsiques. Cette activité a ensuite été mesurée par suivi de la dégradation au cours du temps du substrat chromogène Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, en présence ou non de chymostatine, un inhibiteur de chymotrypsine. Chez les patients atteints de MICI, l'activité chymotrypsique est significativement augmentée d'un facteur 5 en comparaison aux donneurs sains (Figure 45A). Nous avons étudié une possible association de cette augmentation avec le statut actif ou en rémission de la maladie. De par le nombre insuffisant de cas de RCH dans cette cohorte, nous avons décidé de ne pas séparer les individus souffrant

de MC et de RCH dans la suite des analyses, de manière à conserver une puissance statistique suffisante. Alors que l'activité retrouvée en phase de rémission ne diffère pas des donneurs sains, celle retrouvée chez les patients en phase active est significativement augmentée (Figure 45B). Afin de renforcer nos observations, nous avons réalisé des études de corrélation entre le taux de chymotrypsine fécale et plusieurs biomarqueurs couramment utilisés pour déterminer l'activité et la sévérité de ces pathologies. Parmi les marqueurs à notre disposition dans les données cliniques des sujets on retrouve : le taux de calprotectine fécale, le taux de protéine C réactive (CRP) sanguine et le score de Harvey-Bradshaw. La calprotectine est une protéine exprimée par les neutrophiles qui sont connus pour infiltrer massivement la muqueuse intestinale lors des phases de poussée des MICI, en faisant donc un bon marqueur d'inflammation intestinale [404]. La CRP est un marqueur d'inflammation systémique produit par le foie. Enfin, l'indice de Harvey-Bradshaw est un score d'activité de la MC établi sur la base d'un questionnaire, visant à évaluer l'importance des symptômes ressentis par un patient. L'analyse de corrélation que nous avons réalisée montre qu'aucun de ces trois marqueurs n'est fortement corrélé à l'activité chymotrypsique fécale chez les patients étudiés (Figure 46).

D'après nos résultats, le taux de chymotrypsine fécale est donc plus élevé chez les patients souffrant d'une MICI en phase de poussée inflammatoire. Cependant, l'état inflammatoire seul ne suffit pas à expliquer cette activité augmentée, de par son absence de corrélation avec les biomarqueurs d'inflammation classiquement utilisés en clinique.

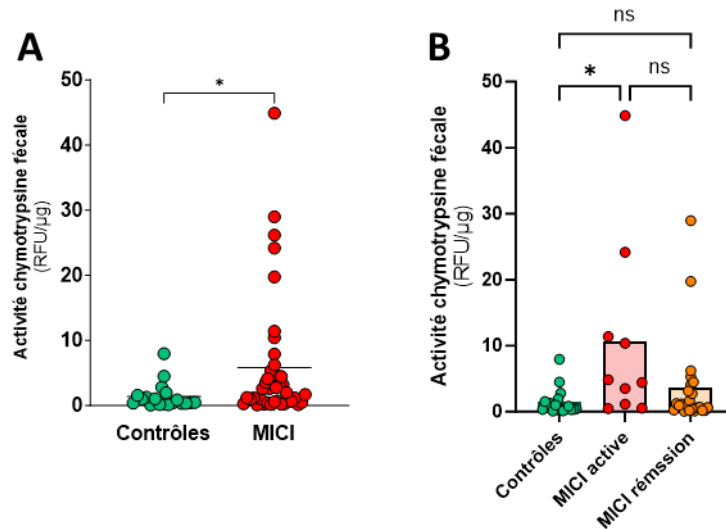


Figure 45: l'activité chymotrypsique fécale est augmentée lors des phases inflammatoires des MICI.

(A) Quantification des activités de type chymotrypsine dans les surnageants fécaux de donneurs sains en comparaison à des patients atteints de MICI. Les matières fécales des différents sujets ont été broyées dans un tampon d'activité et les activités de type chymotrypsine ont été dosées en utilisant le substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC. Les vitesses initiales de dégradation du substrat ont été calculées et le graphique représente l'activité chymotrypsique en Unité Relative de Fluorescence/ μg de protéines totales contenues dans chaque extrait. Chaque point sur le graphique représente un patient. La moyenne est représentée par une ligne horizontale. * $p < 0.05$ (test non paramétrique de Mann-Whitney). (B) Les patients MICI ont été séparés selon que leur maladie soit en phase de poussée inflammatoire (active) au moment du prélèvement ou en phase de rémission. * $p < 0.05$ (test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn).

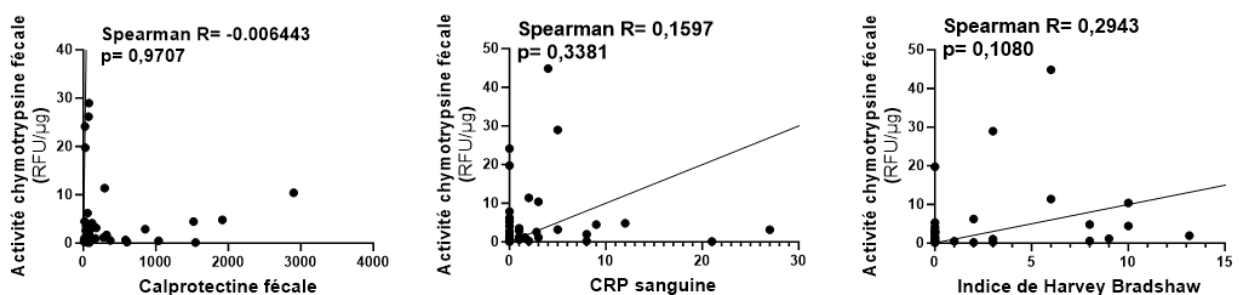


Figure 46: l'activité chymotrypsique fécale n'est pas significativement corrélée avec les marqueurs d'activité clinique des MICI.

Des corrélations de Spearman ont été utilisées pour analyser la relation entre le taux d'activité chymotrypsique fécale chez les patients atteints de MICI et certains paramètres cliniques d'activité de la maladie dont : le taux de calprotectine fécale (à gauche), le taux de protéine C réactive (CRP) sanguine (au milieu), ou le score de Harvey-Bradshaw pour les patients MC (à droite).

Discussion et conclusion

Nos résultats montrent que l'activité chymotrypsique fécale est augmentée de plus de cinq fois chez les patients atteints de MICI, en comparaison à des donneurs sains. De par le faible nombre de patients présentant une RCH inclus dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure de discriminer si une pathologie était plus sujette à cette augmentation ou non. Une augmentation de l'activité protéolytique dans les tissus digestifs ou les fèces de patients souffrant de MICI est un phénomène généralement accepté [330], [405]. A notre connaissance, ces travaux constituent toutefois l'une des rares études à s'être spécifiquement intéressée aux activités de type chymotrypsine au niveau fécal chez des patients MICI. Dans les années 1980, une activité trypsique et chymotrypsique élevée a été décrite dans les fèces de patients souffrant de MC en comparaison à des donneurs sains [406]. Depuis, malgré une tendance à l'augmentation, Bustos *et al.* n'ont toutefois pas noté de différence significative d'activité chymotrypsique fécale chez des patients atteints de RCH [407]. Jablaoui *et al.* ont quant à eux rapporté ne pas avoir été en mesure de détecter une activité de type chymotrypsine dans des fèces de patients atteints de MICI [315].

De plus, aucune étude n'a cherché le lien entre activité chymotrypsique et statut d'activité de la maladie. En effet, les MICI évoluent par des phases de poussées inflammatoires alternées de phases de rémission qui sont caractérisées par la mise en place de processus de réparation tissulaire et de résolution de l'inflammation. Ainsi, selon la phase observée, l'abondance accrue d'un métabolite dans les MICI peut aussi bien être associée à un effet pro-inflammatoire que pro-résolutif. Aux vues des propriétés anti-inflammatoires décrites pour la chymotrypsine dans la littérature, une de nos hypothèses était que son augmentation pouvait être associée à la mise en place de mécanismes bénéfiques dans le contexte des MICI. Nos résultats vont toutefois partiellement à l'encontre de cette hypothèse puisque l'activité de ce type d'enzyme est spécifiquement augmentée chez les patients présentant une maladie active. Il est néanmoins étonnant de constater que le taux de chymotrypsine fécale mesuré ne corrèle avec aucun des paramètres cliniques à notre disposition, couramment utilisés pour suivre le statut inflammatoire des patients (CRP sanguine, calprotectine fécale, inde de H-Bradshaw). Ce qui suggère que l'état inflammatoire seul ne semble pas être responsable de la dérégulation de l'activité chymotrypsique. Il pourrait être intéressant de corrélérer cette activité

avec des scores d'activité endoscopique, données qui n'étaient pas disponibles dans la base de données de notre bio-collection, mais qui restent l'examen standard pour le suivi des MICI. Ceci permettrait d'établir directement si l'activité chymotrypsique est associée aux dommages de la muqueuse ou au contraire à sa réparation.

Jusqu'ici les formes de chymotrypsine d'origine pancréatique ont été le principal objet d'étude de ce manuscrit. Il est toutefois important de préciser que nos données ne nous permettent pas de statuer quant à l'implication spécifique des chymotrypsines pancréatiques dans l'augmentation de l'activité observée. En effet, le substrat que nous avons utilisé peut être clivé par l'ensemble des protéases à activité de type chymotrypsine. Dans le contexte des MICI, le tissu intestinal est infiltré par de nombreuses cellules immunitaires comme des neutrophiles ou des mastocytes. Ces cellules peuvent relarguer de nombreuses protéases dont la cathepsine G, l'élastase du neutrophile, la protéinase-3 ou encore la chymase. Toutes ces protéases possèdent une activité de type chymotrypsine-like et sont abondamment retrouvées lors des MICI [315], [325], [326], [343]. De plus, l'élastase-2 produite par l'épithélium intestinal est aussi capable de dégrader ce type de substrat et son activité est augmentée lors des MICI [318]. Il est donc probable que ces enzymes soient au moins en partie impliquées dans l'activité chymotrypsique mesurée ici.

Pour conclure, les travaux présentés ici ont montré que l'activité chymotrypsique fécale est grandement augmentée chez les patients atteints de MICI. Cette augmentation est spécifiquement retrouvée chez les patients dont la maladie est cliniquement active. Des études complémentaires seront menées afin d'identifier l'origine tissulaire précise de cette activité et son rôle physiopathologique.

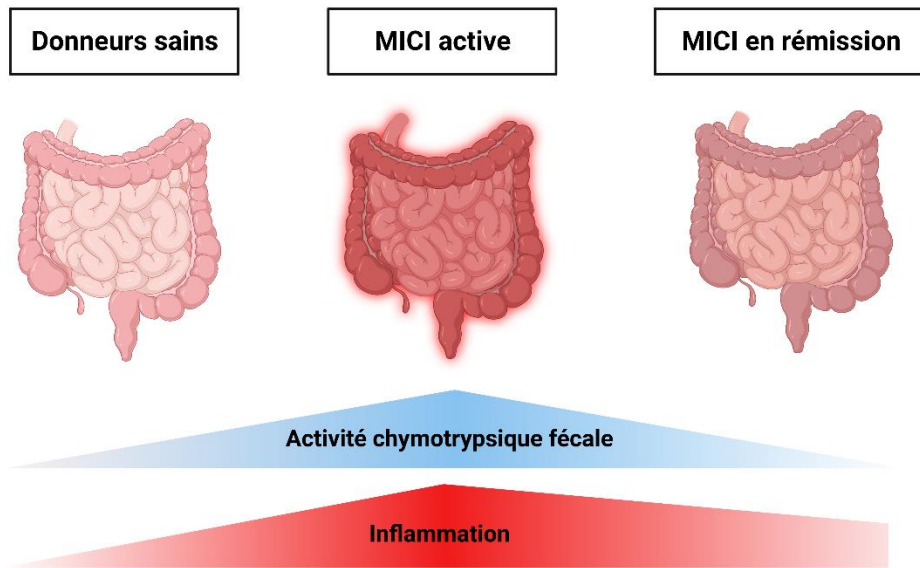


Figure 47: représentation schématique des résultats de l'étude de l'activité chymotrypsique fécale dans les MICI.

Figure créée avec Biorender.com.

Partie 4 : étude exploratoire d'une expression de la chymotrypsine par la muqueuse gastro-intestinale

Introduction

Depuis son identification dans les années 1930, la chymotrypsine est exclusivement considérée comme une enzyme pancréatique sécrétée dans la lumière duodénale. Chez l'Homme, quatre formes de chymotrypsine sont connues comme étant produites par le pancréas. On retrouve, dans un ordre d'abondance décroissant : les chymotrypsines B1 et B2 (CTRB1, CTRB2), la chymotrypsine C (CTRC) et la chymotrypsin-like protease (CTRL). Ces quatre protéases présentent de grandes similitudes en termes d'activité catalytique malgré une faible homologie de séquence [373]. Cependant, de rares travaux dans la littérature font état d'une possible expression extra-pancréatique de chymotrypsine. En 1998, Wang *et al.* ont identifié une expression de la CTRB par la muqueuse digestive chez le rat [382]. En réalisant des immunomarquages avec des anticorps spécifiques de la CTRB, les auteurs ont rapporté que cette enzyme pouvait être exprimée dans de rares cellules parsemées au sein de l'épithélium gastrique et intestinal, sans toutefois parvenir à identifier cette population cellulaire avec précision. Les cellules en question étaient d'aspect triangulaire, granuleux et alors qualifiées de « neuroendocrine-like ». Cette expression n'a jamais été confirmée depuis, mais pourrait représenter un élément important dans l'identification de nouvelles fonctions extra-digestives de la chymotrypsine.

Dans ce cadre, nous avons donc recherché si les différentes formes de chymotrypsine pourraient être exprimées par l'épithélium gastro-intestinal humain et murin.

Résultats

L'ARNm de la chymotrypsine B est exprimé par l'épithélium intestinal murin et sa protéine est retrouvée ponctuellement dans des cellules épithéliales de l'intestin grêle

L'expression transcriptionnelle de la CTRB a d'abord été recherchée par RT-PCR dans différents échantillons intestinaux de souris. Comme attendu, l'amplification du transcrite de la CTRB à partir d'un échantillon pancréatique a montré un signal positif, avec la présence d'un amplicon à la taille attendue de 142 pb (Figure 48A). Ce signal n'était pas présent en absence de rétrotranscription (RT-) et semble donc spécifique. De manière intéressante, des amplicons de taille similaire ont été détectés dans des échantillons de muqueuse intestinale. Un signal positif a ainsi été retrouvé dans différents échantillons murins : des grattages muqueux d'intestin grêle et de colon, des cryptes de colon isolées, ainsi que dans une lignée épithéliale de colon (CMT93) et d'intestin grêle (mICcl2). Le séquençage de ces produits de PCR a confirmé qu'ils correspondaient tous à l'ARNm de la CTRB. Bien que faible, l'expression de la CTRB a aussi été quantifiée par RT-qPCR dans des grattages de muqueuse intestinale (Figure 48B). Son expression a été retrouvée à des niveaux équivalents dans les grattages de muqueuse provenant des trois segments de l'intestin grêle et semble légèrement diminuée dans le colon, sans dimorphisme sexuel apparent. Ces résultats indiquent donc qu'en condition physiologique, l'ARNm de la CTRB est exprimé par l'épithélium intestinal chez la souris.

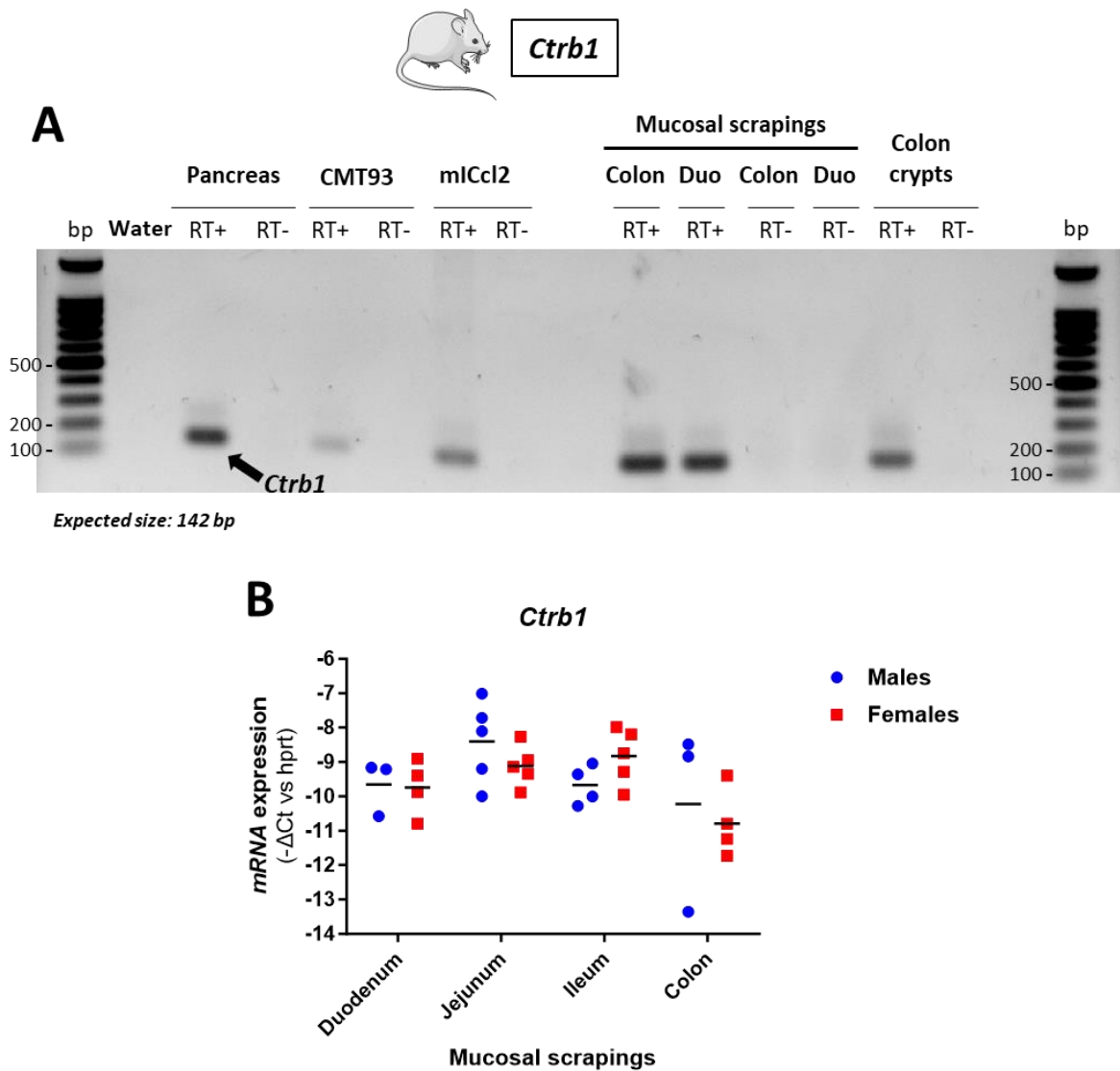


Figure 48: le transcrit de la CTRB est exprimé par l'épithélium intestinal chez la souris.

(A) Analyse de l'expression de l'ARNm du gène *Ctrb1* dans différents échantillons intestinaux murins par PCR semi-quantitative. Les ARN totaux des différents échantillons ont été extraits, puis la transcription inverse des ARN en ADNc a été réalisée en présence (RT+) ou en l'absence (RT-) d'une enzyme transcriptase inverse. La PCR a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques pour la séquence murine du transcrit *Ctrb1* et les amplicons ont été résolus sur un gel d'agarose à 1 %. Un échantillon d'ADNc de pancréas murin a été utilisé comme témoin positif. (bp: paire de base ; Duo: duodénum). (B) Quantification de l'expression de l'ARNm du gène *Ctrb1* le long du tractus intestinal par RT-qPCR. Les résultats sont représentés en valeur d'expression relative (-ΔCt) normalisée par rapport au gène de ménage *Hprt*. Chaque point représente un individu différent et la moyenne de chaque groupe est matérialisée par une ligne horizontale.

Ces investigations ont ensuite été poursuivies au niveau protéique, par immunofluorescence (IF), pour tenter d'identifier les cellules exprimant la CTRB. Afin de valider la spécificité de l'anticorps utilisé en IF, nous avons eu accès à des échantillons histologiques issus de souris déficientes pour le gène *Ctrb1* (*Ctrb1*-KO), grâce à l'équipe de Miklós Sahin-Toth (UCLA, USA). L'absence de la protéine CTRB chez les souris *Ctrb1*-KO a ainsi pu être validée au niveau pancréatique (Figure Supp. 1). La Figure 49 et la Figure 50, illustrent respectivement les immunomarquages obtenus à partir d'iléon et de colon de souris WT, en comparaison aux individus *Ctrb1*-KO. Il convient de noter que le fond génétique C57BL/6 utilisé pour l'ensemble des expériences présentées est naturellement déficient en *Ctrc*, dû à une délétion nucléotidique dans l'un de ses exons [368]. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture et une absence de traduction de la protéine CTRC. Les signaux observés pour la CTRB ne peuvent donc pas être attribués à une reconnaissance aspécifique de la CTRC par l'anticorps utilisé.

Dans l'intestin grêle, un signal aspécifique a été retrouvé dans la *lamina propria* des *Ctrb1*-KO, mais aucun signal n'est visible dans l'épithélium intestinal (Figure 49A, flèches blanches). Ce signal ponctiforme était également visible sur les lames de souris WT. De manière intéressante, la présence de quelques cellules épithéliales immuno-positives pour la CTRB le long des villosités a aussi été spécifiquement observé chez les tissus WT (flèches orange Figure 49A). Cependant, au vu de la rareté des événements observés, une pénétration ponctuelle de chymotrypsine luminale ne peut être totalement exclue. En effet, un signal luminal était également visible dans l'intestin grêle des souris WT, souvent associé à du contenu luminal et parfois retrouvé au contact de la muqueuse (Figure Supp. 2). Ce signal n'était pas retrouvé pour les individus *Ctrb1*-KO et pourrait correspondre à de la CTRB pancréatique dans la lumière intestinale. Dans le colon en revanche, aucun signal n'a pu être mis en évidence (Figure 50).

Ces résultats indiquent donc que l'ARNm de la CTRB est exprimé par l'épithélium intestinal et colique chez la souris. Son expression protéique n'est toutefois pas détectable dans le colon. En revanche, dans l'intestin grêle de rares cellules épithéliales présentent un marquage cytoplasmique chez les souris WT, pouvant suggérer une expression restreinte à un sous-type cellulaire minoritaire.

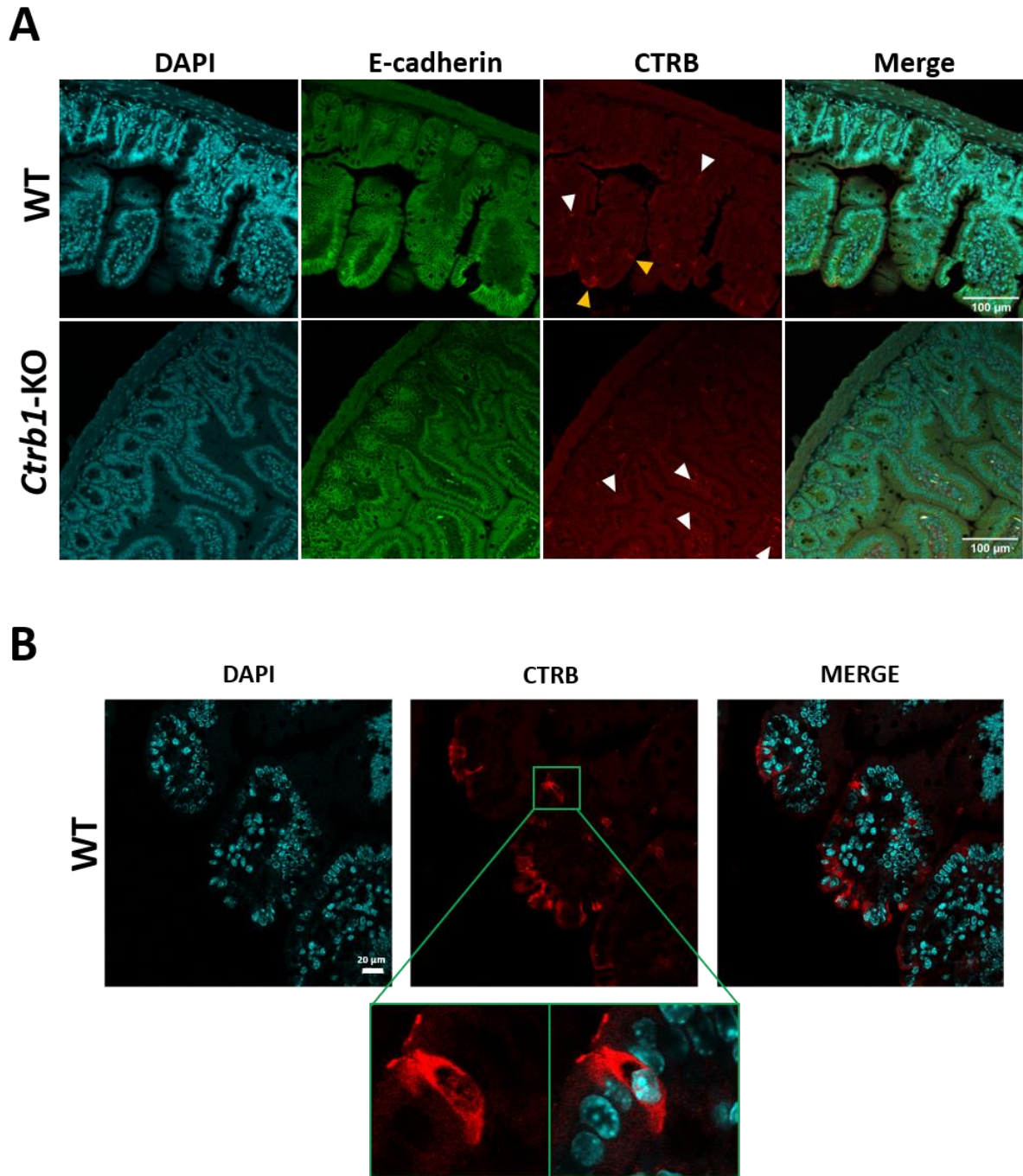


Figure 49: la CTRB est détectée de manière très ponctuelle dans des cellules épithéliales de l'intestin grêle chez la souris.

(A) Images à faible grossissement (20X) d'immunofluorescences réalisées sur des coupes d'intestin grêle provenant de souris WT ou *Ctrb1*-KO, avec un anticorps anti-CTRB (en rouge) et un anticorps anti-E-Cadhérine (en vert, marqueur des membranes de l'épithélium). Une coloration DAPI a été réalisée pour marquer les noyaux. Un signal dans l'épithélium est pointé par les têtes de flèche orange. Un marquage aspécifique est présent dans la *lamina propria* (têtes de flèche blanches). (B) Images à fort grossissement (63X) en mode Tile Scan illustrant la présence de rares cellules isolées présentant un marquage CTRB cytoplasmique (rouge) dans l'intestin grêle des souris WT.

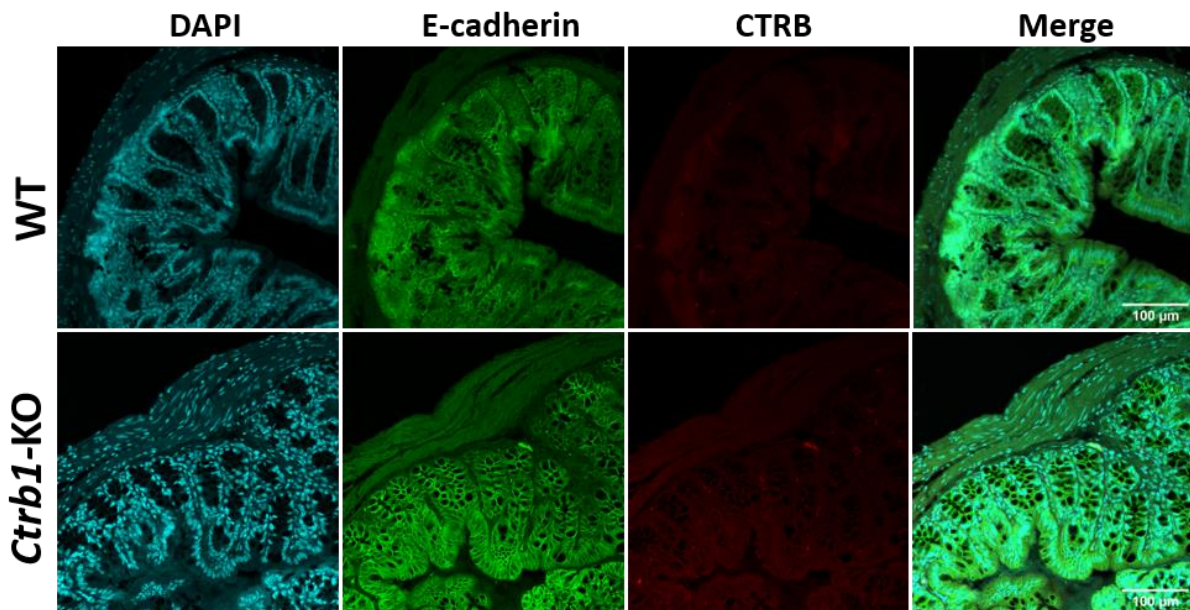


Figure 50: la CTRB n'est pas détectée dans le colon chez la souris.

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des coupes de colon provenant de souris WT ou *Ctrb1*-KO avec un anticorps anti-CTR B (en rouge) et un anticorps anti-E-Cadhérine (en vert, marqueur des membranes de l'épithélium). Une coloration DAPI a été réalisée pour marquer les noyaux. Grossissement 20x.

L'expression intestinale de la CTRB n'est pas retrouvée chez l'Homme

En parallèle de l'étude menée chez la souris, nous avons également recherché l'expression de la CTRB à partir d'échantillons intestinaux humains. Une collaboration avec les Hôpitaux de Toulouse nous a permis d'obtenir des résections d'iléons et de colons prélevés lors d'actes chirurgicaux. Afin d'étudier l'expression de la chymotrypsine en condition saine et inflammatoire, plusieurs types de tissus ont été utilisés lors de ces expériences :

- Des tissus issus de zones saines et distantes des zones lésées, prélevés sur des patients atteints de cancers intestinaux et colorectaux (C).
- Des tissus issus de zones saines (S) ou inflammatoires (I), prélevés sur des patients atteints de MICI.

Sur chacun de ces prélèvements, des échantillons de tissu entier et de compartiment muqueux isolé ont été prélevés.

Une analyse systématique de l'expression de la *CTRB1* par RT-PCR a été réalisée et un extrait de pancréas humain a été utilisé comme témoin positif. Le Tableau 9 récapitule l'origine des échantillons analysés, ainsi que la fréquence de détection de la *CTRB1*. Sur l'ensemble des 18 échantillons analysés, le transcrite de la *CTRB1* n'a été détecté que dans 1 seul et unique échantillon d'origine iléale (Figure 51A, B). L'amplicon obtenu par PCR a été séquencé, confirmant l'identité de l'ARNm de la *CTRB1*. Le tissu en question a été prélevé chez un patient souffrant d'une tumeur neuroendocrine, mais dans une zone distante de la tumeur et macroscopiquement saine. Toutefois, par western-blot, l'expression protéique de la *CTRB* n'a pas été retrouvée dans les échantillons provenant de ce patient (Figure 51C). L'expression du gène paralogue *CTRB2* a été recherchée de manière similaire dans les échantillons issus de patients, montrant des résultats identiques à la *CTRB1* (résultats non montrés).

Dans leur ensemble, ces données ne permettent donc pas de conclure à la présence d'une expression conservée de la *CTRB* par la muqueuse intestinale humaine.

Tableau 9: fréquence de la détection de l'ARNm *CTRB1* au sein des échantillons intestinaux humains analysés.

*zones tissulaires macroscopiquement saines, prélevées à distance de la zone inflammatoire des patients opérés pour une MICI.

Total des échantillons testés					
1/18					
Intestin grêle (iléon)			Colon		
1/11			0/7		
Dont patients MICI		Dont patients non MICI	Dont patients non MICI	Dont patients MICI	
0/6		1/5	0/1	0/6	
Dont tissus issus de zones saines*	Tissus issus de zones lésées			Dont tissus issus de zones saines*	Tissus issus de zones lésées
0/6	0/3			0/3	0/4

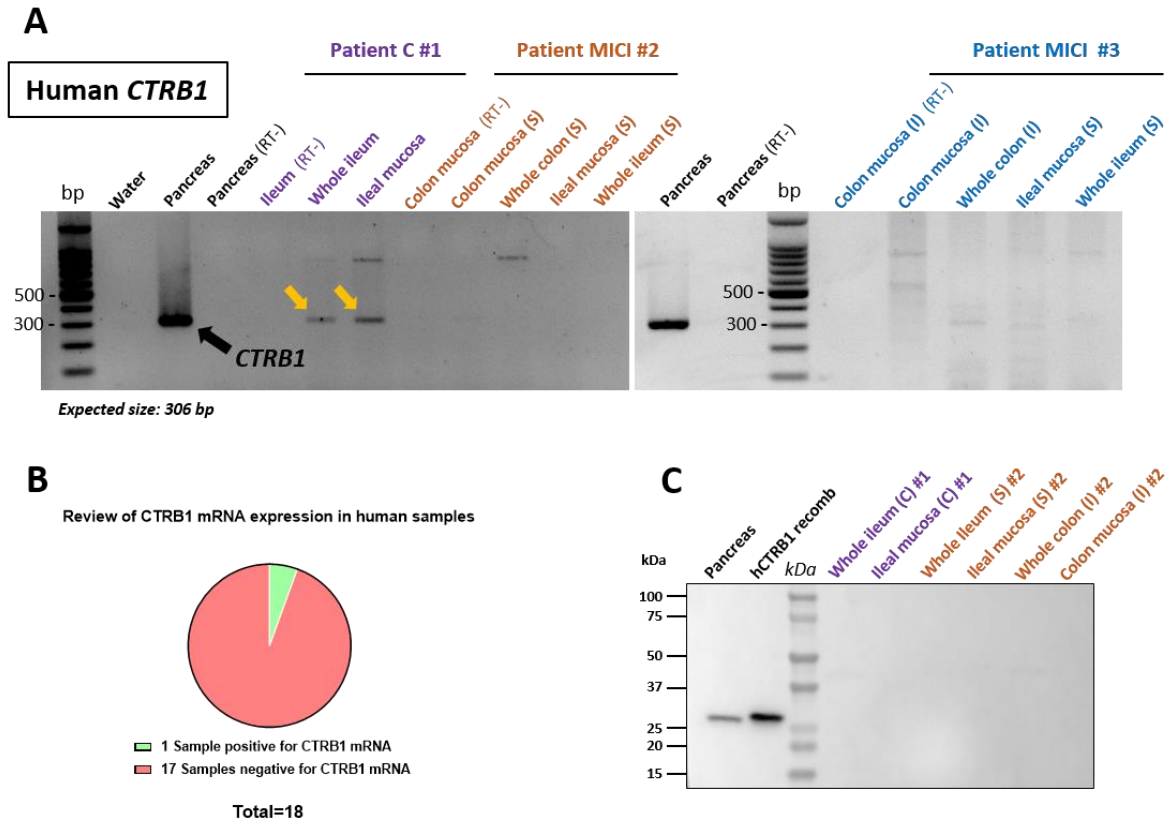


Figure 51: la CTRB n'est pas exprimée par la muqueuse intestinale ou colique humaine.

(A) Analyse de l'expression de l'ARNm du gène *CTRB1* dans différents échantillons intestinaux humains par PCR semi-quantitative. Les expériences ont été réalisées à partir de tissus iléaux et coliques prélevés sur des patients contrôles (C), ou des zones saines (S) et inflammées (I) chez des patients atteints de MICI. Le transcrite de la *CTRB1* n'a été détecté que pour un seul patient (flèches jaunes). Un échantillon de pancréas humain a servi de contrôle positif. (Whole: tissu entier ; mucosa: compartiment muqueux isolé ; RT- : contrôle négatif de RT sans transcriptase inverse). (B) Diagramme circulaire résumant la détection de la *CTRB1* dans l'ensemble des échantillons humains analysés. (C) Immunodétection des *CTRB1/2* dans des échantillons intestinaux humains par WB. Un échantillon de pancréas humain et de protéine *CTRB1* recombinante ont été utilisés comme témoin positif. 20 µg de protéines ont été déposés pour tous les échantillons, excepté pour les témoins positifs afin d'éviter toute saturation précoce du signal. La numérotation « # » marque la correspondance avec les échantillons de patients utilisés en (A).

La chymotrypsine B est détectée dans l'épithélium gastrique murin et humain

En plus d'une expression intestinale, les travaux de Wang et collègues mentionnaient également la présence de *CTRB* dans l'épithélium gastrique chez le rat [382]. Nous avons voulu vérifier ces résultats chez l'Homme et la souris.

Différents segments gastriques (zone non glandulaire et glandulaire : corps et antre) ont été prélevés sur des souris WT et l'expression transcriptionnelle de la CTRB a été analysée par RT-PCR. Comme illustré en Figure 52A, un amplicon correspondant à la taille attendue (142 pb) a été détecté dans chacun des segments gastriques étudiés. Dans ces expériences préliminaires, le signal obtenu semblait plus fort dans le corps et l'antre que dans la partie non glandulaire de l'estomac des souris WT.

Afin d'explorer l'expression protéique de la chymotrypsine dans l'estomac murin, des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de tissu gastrique glandulaire (corps) de souris WT et *Ctrb1*-KO (Figure 52B). De manière intéressante, un signal CTRB a clairement été détecté dans l'épithélium des souris WT, mais pas chez les souris déficientes en chymotrypsine. Ce signal, localisé au fond des glandes gastriques, était d'aspect granuleux, pouvant faire penser à des vésicules de sécrétion orientées vers le pôle apical des cellules glandulaires (Figure 52B, Figure Supp.3). La base des glandes gastriques de la région du corps de l'estomac est enrichie en cellules principales qui sécrètent de grandes quantités de pepsinogène, le précurseur de la pepsine. Nous avons donc réalisé des co-marquages en utilisant un anticorps anti-CTRB et anti-pepsinogène II, afin de visualiser si ces cellules pouvaient être à l'origine du signal observé. Le marquage obtenu pour le pepsinogène est aussi retrouvé au fond des glandes gastriques chez les souris WT, avec un aspect vésiculaire (Figure 52C). De manière intéressante, la CTRB colocalise grandement avec le signal émis par le pepsinogène, suggérant une même origine cellulaire de ces deux enzymes (Figure 52D). Ces résultats indiquent que la CTRB est exprimée par les cellules principales des glandes gastriques chez la souris.

Nous avons ensuite exploré la possible expression de la CTRB dans l'estomac humain. Par une collaboration avec les Hôpitaux de Toulouse, nous avons pu accéder à un échantillon fundique d'estomac humain. L'analyse transcriptionnelle de deux échantillons prélevés à des zones distantes sur la même résection ont permis de détecter la présence d'un amplicon dans la muqueuse gastrique qui correspondait au signal CTRB retrouvé dans le témoin positif pancréatique (Figure 53A). L'identité du transcrite de la CTRB a pu être confirmée par séquençage des produits de PCR. En utilisant un anticorps dirigé contre la CTRB, nous avons observé un marquage comparable à celui observé chez la souris, semblant être localisé au sein des glandes gastriques (Figure 53B, C). Ce signal était absent avec l'anticorps isotypique.

Même si des investigations supplémentaires restent à réaliser, nos résultats montrent qu'en condition physiologique la CTRB pourrait être exprimée par de rares cellules de l'épithélium intestinal murin. Néanmoins, cette expression n'a pas été détectée chez l'Homme. En revanche, elle semble exprimée dans l'estomac murin et humain où elle pourrait être produite par les cellules principales qui sécrètent le pepsinogène.

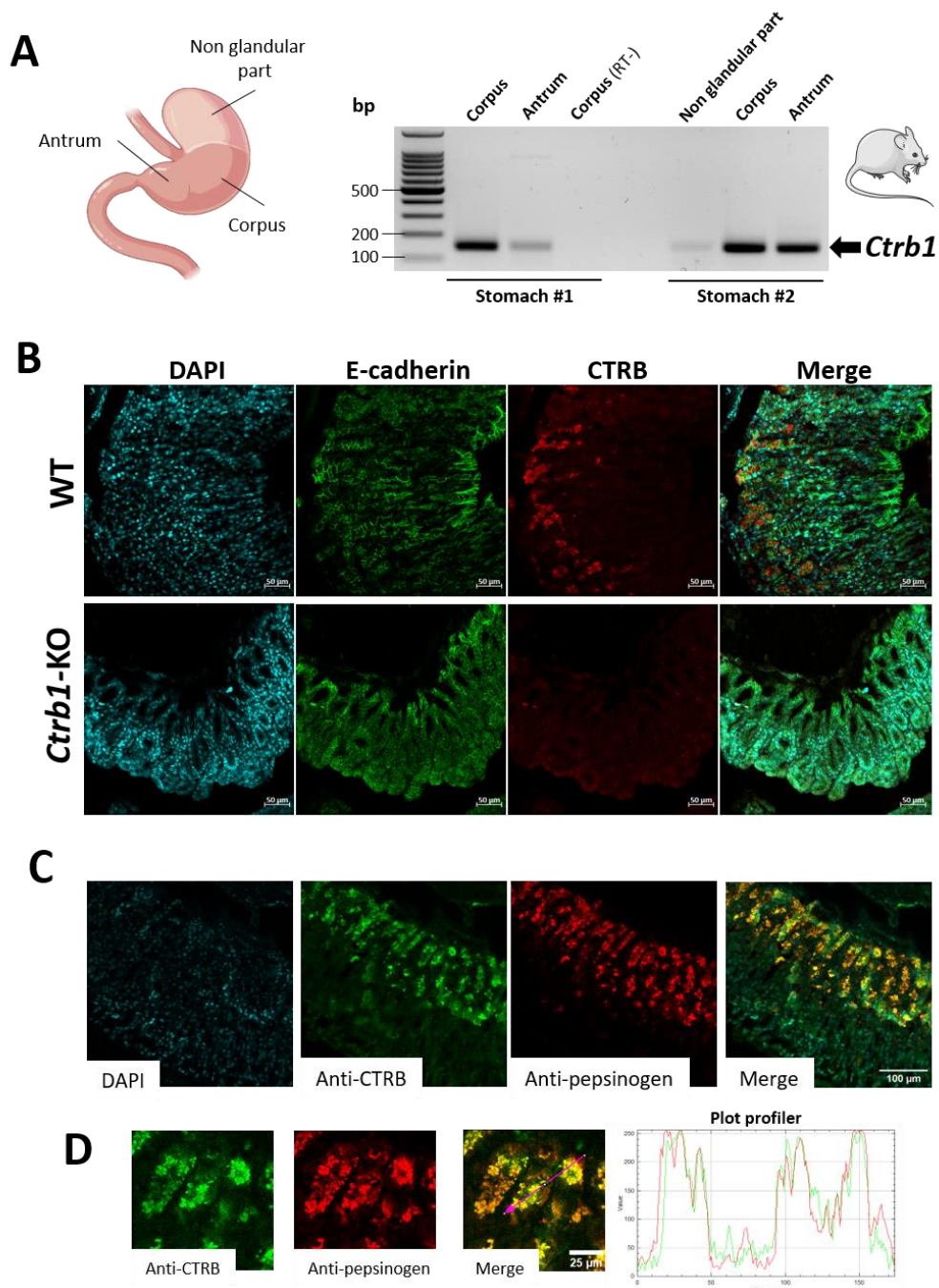


Figure 52: la CTRB est exprimée par les cellules principales de l'épithélium gastrique murin.

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées sur l'estomac murin (corps, antré, zone non glandulaire) avec des amorces spécifiques de la CTRB murine. Les numérotations marquées par un « # » désignent

des échantillons issus d'individus différents. **(B)** Des expériences d'IF ont été effectuées sur des coupes d'estomac de souris WT ou *Ctrb1*-KO, avec des anticorps anti-CTRB (en rouge) et E-cadhérine (en vert). **(C)** Des estomacs de souris WT ont été immunomarqués par des anticorps anti-CTRB (en vert) et anti-pepsinogène (en rouge). **(D)** Un profil d'intensité généré sur ImageJ montre une forte colocalisation des signaux verts et rouges. Les acquisitions ont été faites au microscope confocal avec un objectif 20X.

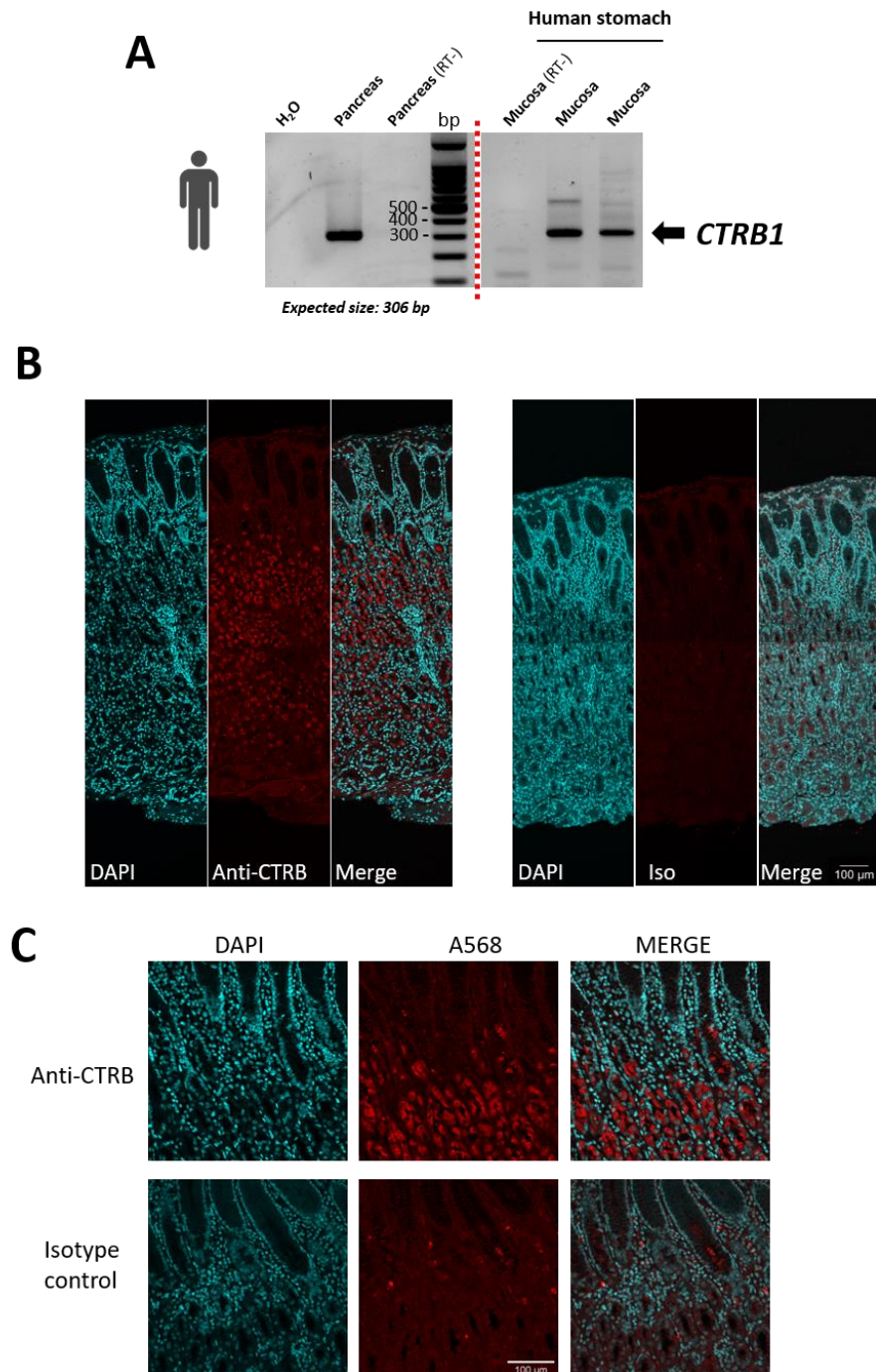


Figure 53: la CTRB est exprimée par l'épithélium gastrique humain.

(A) Des expériences de RT-PCR ont été réalisées à partir d'estomac humain afin d'amplifier l'ARNm de la *CTRB1* humaine. Un échantillon de pancréas humain a servi de contrôle positif. (RT-) : contrôle négatif de RT sans transcriptase inverse. Les pointillés verticaux indiquent la position de pistes non pertinentes excisées. **(B-C)** Des expériences d'IF ont été effectuées sur des coupes d'estomac humain avec un anticorps anti-CTRB. Un contrôle isotypique a été effectué. Les images ont été acquises au microscope confocal au grossissement 20X en mode Tile Scan **(C)** ou mode classique **(D)**.

L'ARNm de la chymotrypsin-like protease (CTRL) est détecté dans la muqueuse intestinale chez l'Homme

En dehors de la chymotrypsine B (CTRB), deux autres formes de chymotrypsine sont connues : la chymotrypsine C (CTRC) et la chymotrypsin-like protease (CTRL). Bien que minoritaires, ces formes sont toutes deux exprimées au niveau pancréatique mais leur possible expression extra-pancréatique n'a jamais été explorée jusque-là. Dans la continuité de notre étude, nous avons donc recherché si ces formes de chymotrypsines pouvaient être exprimées par la muqueuse digestive humaine.

L'expression des ARNm de la CTRC et de la CTRL a été recherchée par RT-PCR dans les tissus intestinaux humains évoqués précédemment. Le transcrite de la CTRC n'a été détecté dans aucun des échantillons testés (Figure 54A-B). En revanche, malgré la présence de bandes aspécifiques de haut poids moléculaire, un amplicon de même taille que celui de la CTRL pancréatique a été identifié dans 12 des 13 échantillons intestinaux analysés (Figure 54C-D). L'identité exacte de cet amplicon reste à vérifier par séquençage.

Ensemble nos résultats indiquent que, chez l'Homme, si l'expression de la CTRB pourrait être restreinte à l'estomac, la CTRL pourrait quant à elle être exprimée par la muqueuse intestinale humaine. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer au niveau protéique, mais de manière intéressante, l'amplicon de la CTRL était retrouvé aussi bien dans l'intestin grêle que dans le colon des patients et ce, quelle que soit leur pathologie. La recherche de l'expression de CTRL reste aussi à mener chez la souris.

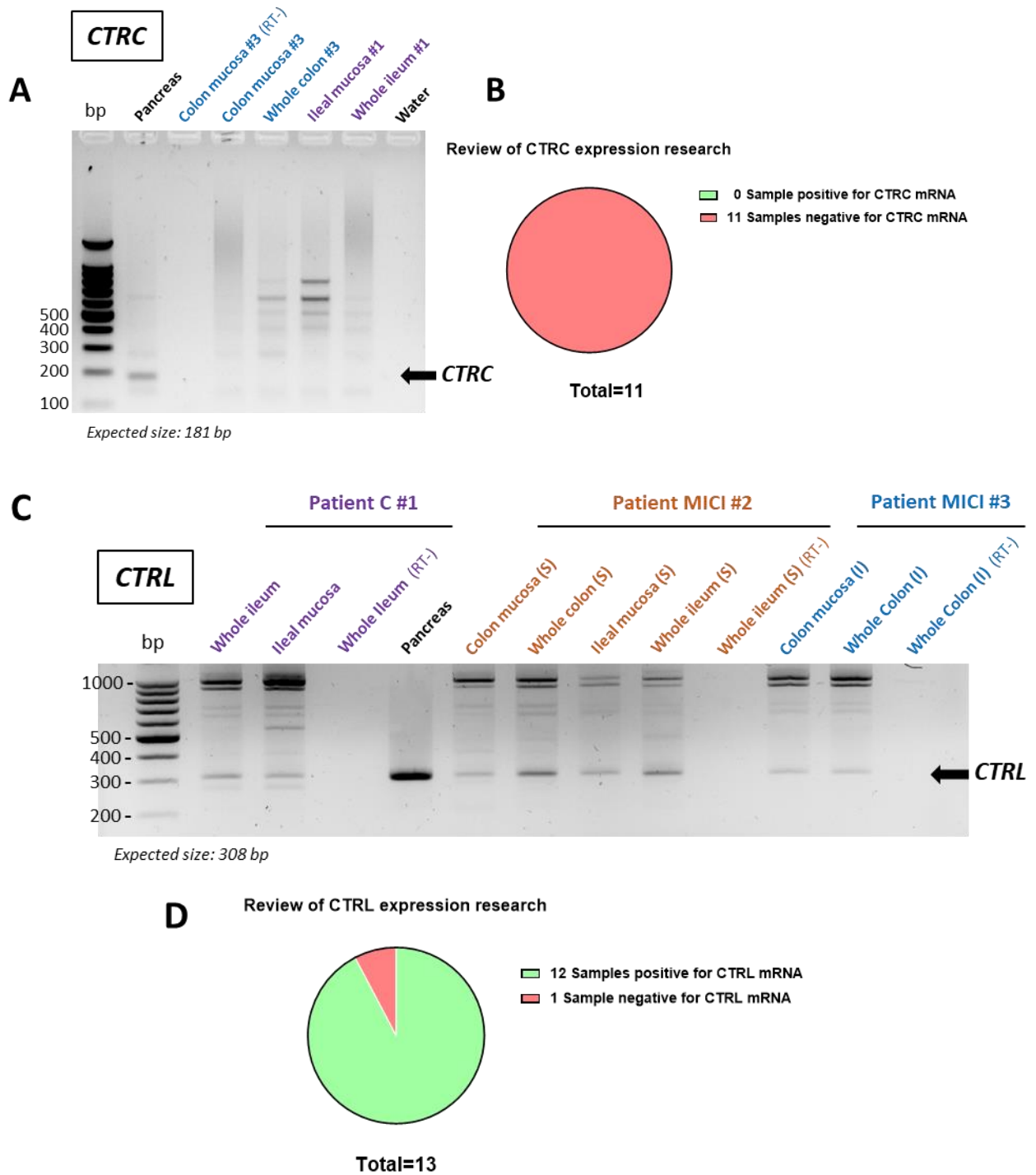


Figure 54: la chymotrypsin-like protease (CTRL) pourrait être exprimée par l'épithélium intestinal humain.

Analyse de l'expression de l'ARNm du gène *CTRC* (A) et *CTRL* (C) dans différents échantillons intestinaux humains par PCR semi-quantitative. Les expériences ont été réalisées à partir de tissus iléaux et coliques prélevés sur des patients contrôles (C), ou des zones saines (S) et inflammées (I) chez des patients atteints de MICI. Un échantillon de pancréas humain a servi de contrôle positif. (Whole: tissu entier ; mucosa: compartiment muqueux isolé ; RT- : contrôle négatif de RT sans transcriptase inverse). (B, D) Diagrammes circulaires résumant la détection des transcrits *CTRC* et *CTRL* dans l'ensemble des échantillons humains analysés.

Discussion et conclusion

L'épithélium intestinal est une source importante de protéases sécrétées qui jouent des rôles prépondérants dans l'homéostasie intestinale. L'expression de la chymotrypsine par ce tissu restait à élucider.

Chez la souris, nos analyses transcriptionnelles ont montré que l'ARNm de la CTRB est exprimé par l'épithélium intestinal. Cette expression n'a pas été confirmée par IF au niveau colique, mais de rares cellules épithéliales immuno-positives à la CTRB ont été observées dans l'intestin grêle des souris WT. Leur absence chez les animaux *Ctrb1*-KO suggère une expression circonscrite à une population cellulaire minoritaire de l'épithélium intestinal, dont la nature demeure inconnue. Ceci est étayé par le niveau d'expression extrêmement faible du transcrit *Ctrb1* mesuré par RT-PCR quantitative qui n'est pas en faveur d'une expression cellulaire étendue à l'ensemble de l'épithélium. Cependant, l'hypothèse d'une pénétration de chymotrypsine luminale, d'origine pancréatique, dans les cellules immuno-positives observées dans l'intestin grêle ne peut être exclue. Cette idée pourrait être soutenue par d'anciennes données de la littérature indiquant que certaines protéases, dont la chymotrypsine pourrait passer la barrière épithéliale intestinale [408], [409]. Toutefois, aucune donnée récente de la littérature n'abonde cette hypothèse. A l'avenir, l'utilisation d'un modèle de souris comportant une délétion du gène *Ctrb1* spécifiquement au niveau pancréatique permettrait de trancher quant à cette expression.

Chez l'homme, nos résultats ne sont pas en faveur d'une expression de la CTRB au niveau intestinal. En effet, seul un échantillon intestinal sur les 18 patients testés s'est avéré positif pour le messager de la *CTRB1*. Ce tissu a été prélevé dans une zone saine d'iléon chez un patient opéré pour une tumeur neuroendocrine. Il était le seul patient atteint de cette pathologie dans la cohorte étudiée. Ceci interroge sur la néo-expression de cette enzyme lors de ce type de pathologie.

L'expression et la production de protéases par l'épithélium intestinal semble particulièrement sensible à l'environnement cellulaire et est augmentée en condition de stress cellulaire ou d'inflammation comme lors des MICI [317], [318]. Il est intéressant de noter que d'après nos données, l'expression de la CTRB par la muqueuse intestinale ne semble

pas induite par ces conditions car elle n'a pas été détectée dans des tissus provenant de patients atteints de MICI, ni au niveau de zones saines, ni aux sites inflammatoires.

En revanche, notre étude rapporte pour la première fois une expression transcriptionnelle de la « chymotrypsin-like protease » (CTRL) par la muqueuse intestinale humaine. A la différence de la CTRC et de la CTB, l'ARNm de cette protéase a été détecté dans la quasi-totalité des échantillons intestinaux humains analysés, quel que soit leur origine tissulaire (intestin grêle, colon) ou la pathologie des patients. Bien que préliminaires, ces résultats sont en désaccord avec ceux de Reseland *et al.* ayant cloné le gène de la CTRL chez l'Homme et qui, à l'époque, n'avaient observé sa présence qu'au niveau pancréatique et pas dans des échantillons d'intestin grêle ni de colon [372]. Cette identification est d'autant plus intéressante qu'à l'heure actuelle le rôle précis de cette enzyme reste énigmatique au niveau pancréatique. Elle est présente de manière très minoritaire dans les sucs pancréatiques et à la différence de la CTB et CTRC, son expression n'est pas suffisante pour exercer un rôle protecteur vis-à-vis de pancréatites expérimentales chez la souris, via la dégradation du trypsinogène [373]. Si l'expression de cette enzyme venait à être confirmée, elle ouvrirait donc de nouveaux questionnements quant à la fonction physiologique de cette protéase dans le tractus digestif.

Un des résultats majeurs de cette étude est la découverte d'une expression de la CTB dans l'estomac murin et humain. Par IF, nous avons en effet détecté la présence d'un marquage localisé au fond des glandes gastriques, d'aspect granuleux et pouvant faire penser à des vésicules de sécrétion. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Wang *et al.* qui observaient un immunomarquage dans l'épithélium gastrique de rat, semblable à celui que nous observons (voir Figure 35 du chapitre 3 de l'introduction) [382]. Les auteurs proposaient alors que les cellules exprimant cette protéase pourraient être des cellules entéro-endocrines, productrices d'hormones, contenues dans les glandes gastriques. Nos analyses indiquent que les cellules productrices de CTB seraient en réalité les cellules principales des glandes gastriques, car le signal observé colocalise parfaitement avec le pepsinogène, un des produits de sécrétion majeurs de ce type cellulaire. Ces travaux devront donc être poursuivis mais questionnent sur la fonction précise que pourrait occuper la CTB au sein des cellules principales de l'estomac.

En définitive, les résultats présentés ici confortent l'hypothèse que les chymotrypsines pourraient être exprimées de manière extra-pancréatique par l'épithélium gastro-intestinal. Nous avons montré que la CTRC et que la CTRB ne sont pas exprimées de manière large et conservée par la muqueuse intestinale et colique humaine. Cependant, la CTRB est exprimée par les cellules principales de l'estomac où sa fonction reste jusqu'ici inconnue. L'ARNm de la CTRL, l'isoenzyme chymotrypsique la moins bien caractérisée a aussi été détectée dans des tissus iléaux et coliques humains. Ces données pourraient permettre de découvrir de nouveaux rôles physiologiques de ces enzymes dans l'épithélium digestif.

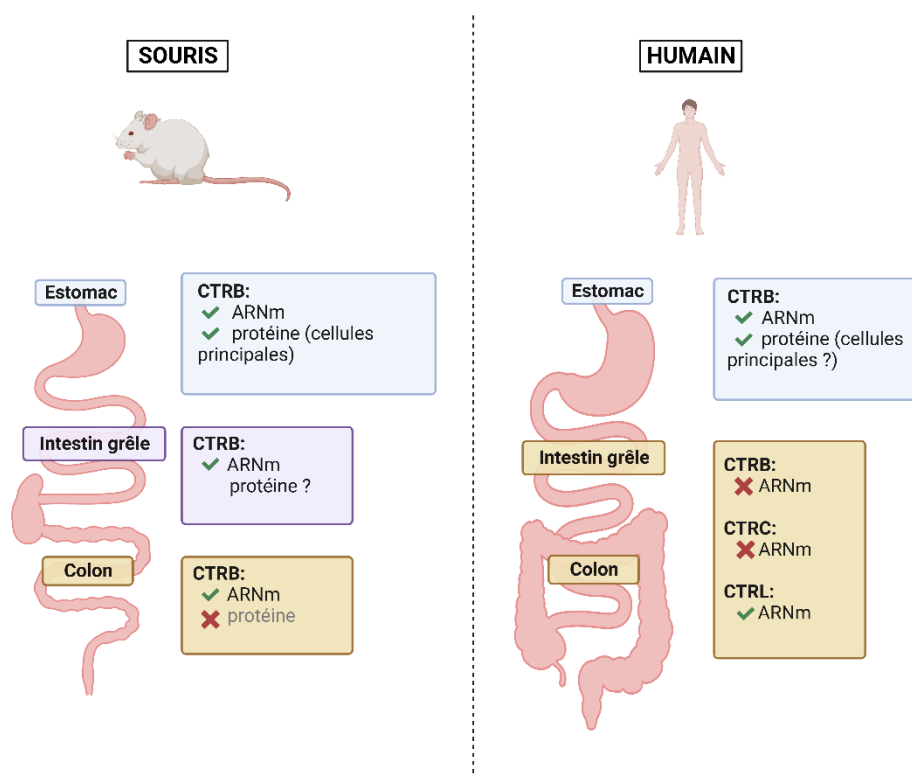


Figure 55: représentation schématique des résultats de l'étude de l'expression de la chymotrypsine par la muqueuse gastro-intestinale.

Figure créée avec Biorender.com.

Figures supplémentaires

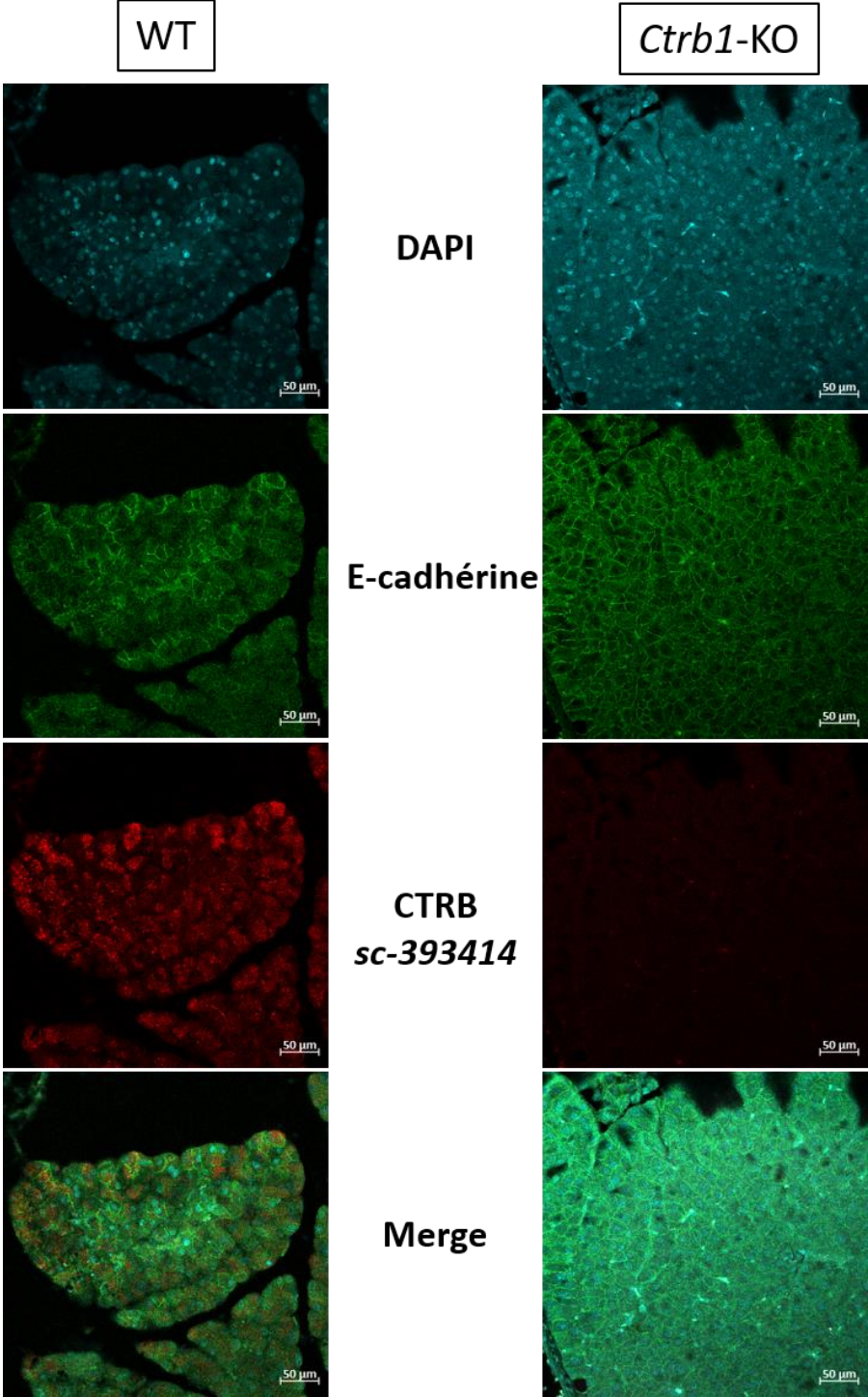


Figure Supp. 1 : Validation de la spécificité de l'anticorps anti-CTR B dans le pancréas des souris *Ctrb1*-KO.

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des coupes de pancréas provenant de souris WT ou *Ctrb1*-KO avec un anticorps anti-CTR B (ref: sc-393414, en rouge) et un anticorps anti-E-

Cadherine (en vert, marqueur des membranes de l'épithélium). Une coloration DAPI a été réalisé pour marquer les noyaux. Grossissement 20x.

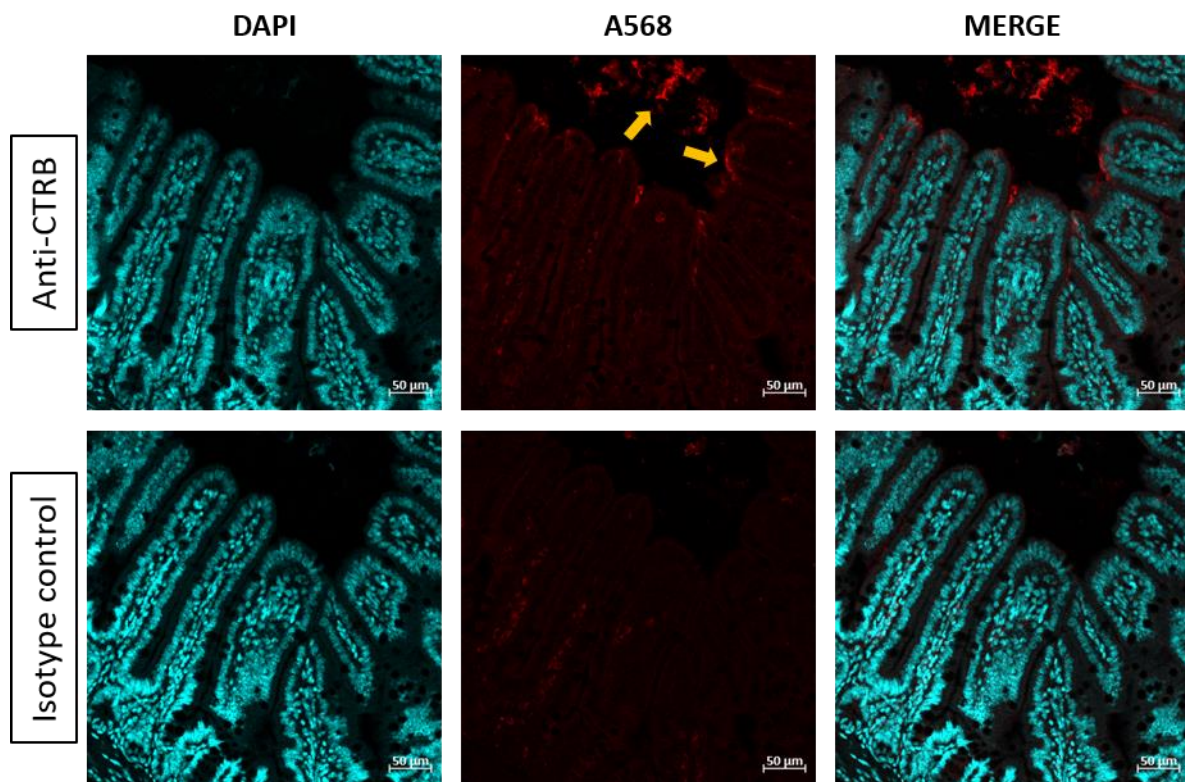


Figure supp.2 : la CTRB est détectée dans la lumière intestinale chez les souris WT.

Immunofluorescence réalisée sur une coupe d'intestin grêle provenant d'une souris WT, illustrant la présence d'un marquage CTRB dans la lumière intestinale, y compris à proximité des cellules épithéliales (flèches jaunes). Grossissement 20x.

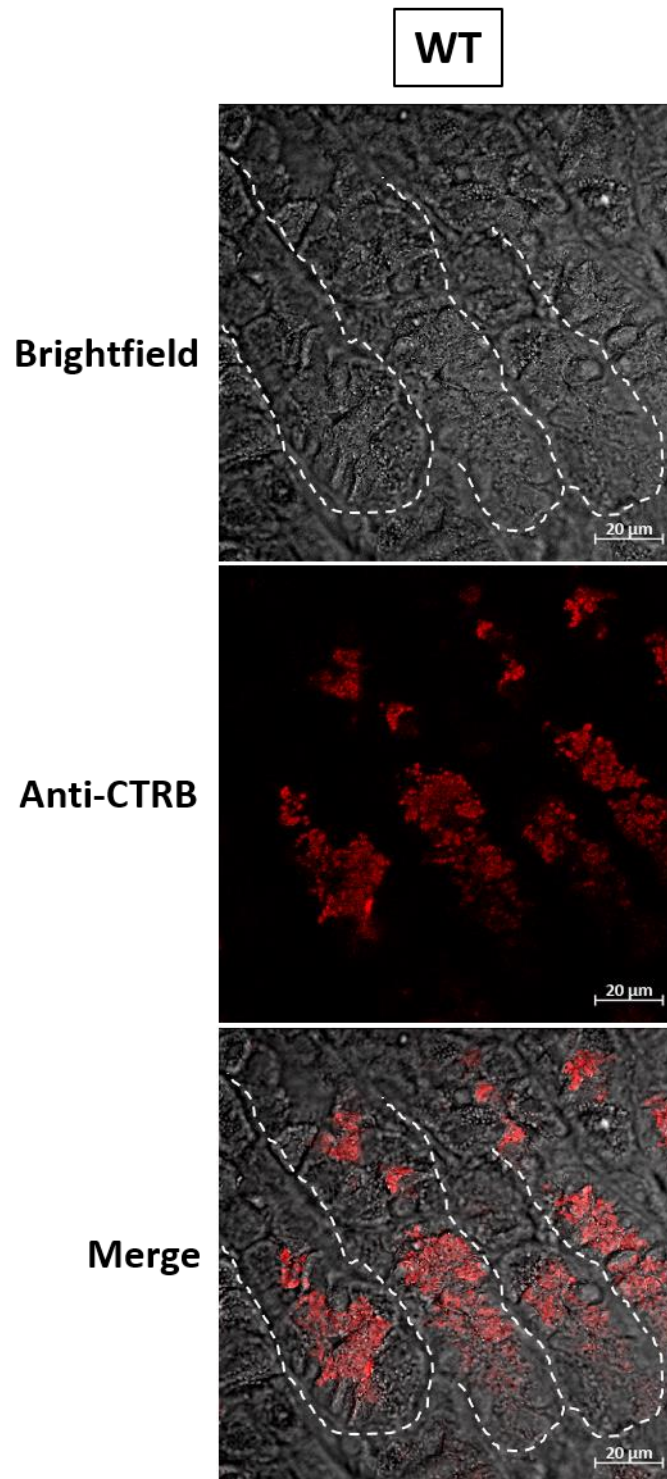


Figure suppl. 3 : un marquage CTRB est détecté au fond des glandes gastriques chez les souris WT.

Des expériences d'IF ont été effectuées sur des coupes d'estomac glandulaire de souris WT avec un anticorps anti-CTRB (en rouge). Le signal CTRB a été superposé à l'image obtenue en champs clair (Brightfield). La bordure des glandes gastriques a été délimitée par des pointillés. Grossissement 40x.

Discussion générale

Le maintien des fonctions intestinales implique des interactions complexes et finement régulées entre des acteurs extrinsèques (bol alimentaire, microbiote intestinal) et intrinsèques de l'organisme (épithélium, système immunitaire, système nerveux, stroma). L'ensemble de ces acteurs produisent ou contiennent des enzymes protéolytiques qui sont retrouvées de manière très abondante dans l'intestin, tant au niveau tissulaire que luminal. De par l'aspect irréversible du clivage qu'elles catalysent, une balance protéolytique dérégulée peut avoir de graves conséquences sur l'homéostasie intestinale. La caractérisation des acteurs protéolytiques de l'intestin est donc primordiale.

Le projet de thèse décrit dans ce manuscrit s'est attaché à comprendre comment une protéase luminale, historiquement connue pour ses fonctions digestives, pourrait exercer des fonctions bien plus larges en modulant la physiologie intestinale. L'une de nos hypothèses principales était que la chymotrypsine peut interagir avec l'épithélium intestinal et ainsi réguler des fonctions clés de ce tissu.

Tout en récapitulant les résultats majeurs obtenus, cette dernière partie sera donc dédiée à la discussion des rôles physiologiques et pathologiques potentiels de la chymotrypsine dans le tractus digestif, ainsi qu'à l'exposé des futurs développements expérimentaux qu'offrent ces travaux.

1. Quels rôles extra-digestifs pour la chymotrypsine dans l'intestin ?

La chymotrypsine est une protéase pancréatique déversée en grande quantité dans la lumière intestinale. L'activité de la chymotrypsine est très importante dans l'intestin grêle et cette enzyme est capable de s'adsorber à la muqueuse sous sa forme active [375]. En plus de l'intestin grêle, nos données montrent que de la chymotrypsine active est présente à proximité de l'épithélium colique dans des conditions physiologiques, rendant la question des interactions entre cette protéase et l'épithélium pertinente tout au long du tractus intestinal.

1.1. Le modèle organoïde, un premier pas vers la compréhension des rôles biologiques de la chymotrypsine

La proximité des cellules épithéliales intestinales avec la chymotrypsine ouvre la voie à de nouvelles fonctions jusqu'ici inconnues de cette enzyme, allant bien au-delà de sa seule implication digestive. Nous avons donc cherché à identifier ses effets vis-à-vis des cellules épithéliales.

Nous avons montré pour la première fois qu'une exposition chronique à la chymotrypsine modifie le profil transcriptionnel des organoïdes coliques humains. En particulier, cette enzyme régule à la hausse des gènes codant des facteurs importants pour l'immunité intestinale (*IL10*), la physiologie des CSI (*LGR5*), mais aussi des cellules caliciformes (*MUC2*) et entéro-endocrines (*CHGA*). Cette découverte permet d'émettre plusieurs hypothèses quant aux rôles de la chymotrypsine dans la régulation des fonctions de l'épithélium.

a) La chymotrypsine contrôle-t-elle le destin des cellules épithéliales intestinales ?

Les résultats exposés précédemment interrogent sur la signification biologique de l'augmentation simultanée des marqueurs *LGR5*, *CHGA* et *MUC2* induite par la chymotrypsine.

Une hypothèse envisageable est que la chymotrypsine pourrait influencer le destin des cellules épithéliales en favorisant en même temps une augmentation du pool de cellules souches/progénitrices et de leur différenciation sécrétoire vers les lignages caliciformes et entéro-endocrines. Cette idée est appuyée par le fait que le récepteur *Lgr5* intervient dans la voie de signalisation Wnt et que le maintien de l'activation de cette voie est nécessaire pour la différenciation sécrétoire des CSI [28]. Des études ont même avancé que certains progéniteurs sécrétoires continueraient à exprimer *Lgr5* [79].

Toutefois, nous pouvons supposer qu'un enrichissement des organoïdes en populations cellulaires souches ou différenciées modifierait la croissance ou la morphologie des organoïdes en culture, ce qui n'a pas été observé lors de nos expériences. De plus, l'expression du facteur de différenciation sécrétoire *ATOH1* ne différait pas entre la condition contrôle et chymotrypsine. Ces arguments seraient donc en faveur d'une expression plus forte

des facteurs *LGR5*, *CHGA* et *MUC2* par un même nombre de cellules, plutôt qu'une expansion des populations cellulaires souches, caliciformes et entéro-endocrines au sein des organoïdes. **Pour confirmer cette seconde hypothèse, des approches de cytométrie en flux ou d'immunomarquages ciblant ces marqueurs pourront être réalisées afin de quantifier ces populations cellulaires.**

A ce stade, il convient de préciser que le milieu de culture utilisé pour nos expériences dérive du protocole utilisé par Sato *et al.*, permettant un maintien des organoïdes en culture sur le long terme [181]. Ce milieu, particulièrement riche en facteur Wnt-3a, vise à mimer l'environnement de la niche des CSI ce qui favorise leur auto-renouvellement et leur prolifération. Par définition, ces conditions de culture soutiennent donc préférentiellement le développement de structures immatures peu différenciées. A l'avenir, il pourrait être judicieux d'explorer l'impact de la chymotrypsine sur un épithélium plus mature en utilisant des milieux de différenciation présentant une quantité réduite de Wnt-3a. Ceci pourrait permettre de discriminer plus facilement un effet de cette enzyme sur les capacités prolifératives des CSI, par rapport à des effets sur un épithélium mature. De plus, certaines publications ont établi des protocoles de différenciation dirigée des organoïdes vers un lignage cellulaire particulier (cellules absorbatives, caliciformes, entéro-endocrines, Paneth) en modulant l'apport des facteurs de croissance contenus dans le milieu de culture [410], [411]. Ce type de protocole pourrait être utilisé afin de voir si la chymotrypsine induit des effets distincts entre les différentes populations cellulaires de l'épithélium.

b) La chymotrypsine, bénéfique ou délétère pour l'épithélium intestinal ?

Dans la littérature, les protéases ont souvent été étudiées pour leurs effets délétères sur l'homéostasie tissulaire via la dégradation des constituants cellulaires ou l'induction de processus inflammatoires [412], [413].

De manière intéressante, dans nos conditions expérimentales la chymotrypsine n'induit pas d'expression de marqueurs de stress cellulaire (*ATF4*, *ATF6*), d'autophagie (*ATG16L1*) ou de médiateurs associés à l'inflammation (*TNF*, *CXCL8*, *IL1b*, *IL18*). A contrario, en réponse à la chymotrypsine nous avons plutôt observé une augmentation de l'expression

de gènes liés à la « protection » de la muqueuse comme *MUC2* ou *IL10*, pouvant suggérer des rôles bénéfiques de cette enzyme.

La mucine 2 (*MUC2*), sécrétée par les cellules caliciformes, est la principale protéine structurante du mucus intestinal qui forme une véritable barrière physique entre la muqueuse et le contenu luminal. Le maintien d'une production adéquate de mucines est un élément essentiel à la préservation de l'homéostasie intestinale et une déplétion de la couche de mucus est observée dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme la RCH [49]. De ce point de vue, la stimulation de *MUC2* par la chymotrypsine pourrait donc être interprétée comme un mécanisme protecteur, favorisant la production de mucus et protégeant ainsi la muqueuse intestinale des éléments luminaux.

L'IL10 (interleukine-10) est quant à elle une cytokine anti-inflammatoire capable d'inhiber la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8) [414]. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle de la tolérance immunitaire intestinale. Les souris déficientes pour l'IL-10 sont d'ailleurs prédisposées au développement d'une colite [415]. Cette cytokine est exprimée par bon nombre de cellules immunitaires dans l'intestin et le colon, mais également par l'épithélium qui exprime aussi ses récepteurs IL10R1 et R2 sur lesquels elle peut agir de manière autocrine [402]. En plus de ses fonctions immunomodulatrices, un niveau de preuve croissant montre que l'IL-10 pourrait avoir des rôles bénéfiques en contrôlant les fonctions épithéliales. Plusieurs études ont notamment associé cette cytokine à l'auto-renouvellement des CSI, le renforcement des jonctions serrées ou encore la promotion de la formation de la couche de mucus à la surface de l'épithélium [416], [417], [418], [419].

En outre, l'augmentation de l'expression de *LGR5* par la chymotrypsine pourrait aussi être interprétée comme un évènement bénéfique pour l'épithélium. *Lgr5* est un des principaux marqueurs des CSI utilisés à ce jour [20]. Ce récepteur membranaire aux protéines de la famille R-spondine potentialise la voie Wnt/ β -caténine qui est indispensable à l'auto-renouvellement des CSI [420]. De plus, une altération de la niche des CSI et une diminution de l'expression de *LGR5* a été rapportée dans des modèles murins de MICI [421], [422].

L'ensemble de ces résultats est particulièrement intéressant au regard d'autres données de la littérature présentées précédemment et qui montrent des rôles bénéfiques de

la chymotrypsine dans différents contextes tissulaires. *In vitro*, Swystun et al. ont par exemple montré que la fonction barrière de cellules épithéliales intestinales était augmentée en réponse à des stimulations apicales de chymotrypsine [387]. D'autres données de la littérature attribuent aussi des vertus anti-inflammatoires à la chymotrypsine dans divers contextes inflammatoires [390], [423], [424].

En somme, même si il est décrit qu'un accès incontrôlé des protéases digestives à la barrière épithéliale intestinale peut compromettre son intégrité [162], nos données suggèrent toutefois que des concentrations contrôlées de chymotrypsine comme celles utilisées sur les organoïdes pourraient avoir un effet bénéfique sur l'épithélium intestinal.

In vivo, la sécrétion des enzymes pancréatiques vers la lumière intestinale n'est pas permanente mais est stimulée lors des phases de prise alimentaire. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que l'arrivée de cette enzyme digestive dans le tractus intestinal peut représenter un signal d'alarme induisant des mécanismes d'adaptation de l'épithélium via la production de facteurs de protection de la muqueuse (MUC2), de maintien des cellules souches (LGR5), et de contrôle de la réponse immunitaire (IL-10) pour se protéger des éléments exogènes du bol alimentaire.

2. La chymotrypsine, un nouvel acteur de la signalisation protéolytique dans l'intestin ?

Nous avons montré que la chymotrypsine pourrait réguler la fonction des cellules épithéliales intestinales. Dans cette continuité, la question des cibles cellulaires et moléculaires utilisées par la chymotrypsine pour médier ses effets est primordiale pour mieux comprendre ses rôles biologiques.

Jusqu'à présent, aucune étude ne s'était intéressée à la capacité de cette enzyme à induire des signaux cellulaires dans un contexte intestinal. Par nos travaux, nous avons montré pour la première fois que la chymotrypsine était capable de moduler la signalisation des cellules épithéliales intestinales en clivant les récepteurs PARs. Nos études pharmacologiques ont montré que la chymotrypsine active PAR2 en clivant au niveau de son site canonique (R³⁶/S³⁷), déclenchant une signalisation intracellulaire via la phosphorylation des protéines

ERK1/2 et l'induction d'une signalisation calcique. A l'inverse, elle désarme PAR1 en tronquant son peptide agoniste, prévenant ainsi son activation ultérieure par la thrombine. Les PARs ont des effets pléiotropes dans l'intestin.

2.1. Effets potentiels de l'activation de PAR2 par la chymotrypsine

Lors de nos expériences sur les organoïdes, l'induction d'*IL10* par la chymotrypsine semblait dépendante du récepteur PAR2 puisqu'elle était fortement réduite par l'antagoniste I-191 (de manière non significative). Il s'agit à notre connaissance de la première description d'un lien entre PAR2 et expression d'*IL10* par les cellules épithéliales. En effet, l'activation épithéliale de PAR2 par ses agonistes canoniques (trypsine, peptides agonistes) a, jusqu'ici, plutôt été reliée à l'induction de chimiokines pro-inflammatoires comme la CXCL8 [336], [425], [426]. **Sachant qu'ils semblent partager des voies de signalisation communes, quels mécanismes moléculaires pourraient sous-tendre les effets divergents entre la chymotrypsine et les activateurs canoniques de PAR2 ?**

Nous avons mis en évidence que la chymotrypsine induisait une signalisation calcique biphasique chez les cellules CMT93, mettant en jeu une entrée importante de calcium extracellulaire via le recrutement des canaux de type CRACs (calcium release-activated calcium channels). Outre leur rôle primaire dans la réplétion des stocks intracellulaires de calcium, ces canaux jouent un rôle important dans la prolongation et la potentialisation des signaux cellulaires. Dans des cellules épithéliales coliques HT-29, il a récemment été montré que l'activation des CRACs en aval de PAR2 prévenait la signalisation pro-inflammatoire induite par le TNF α , en activant la voie des MAPK [427]. L'activation des CRACs pourrait donc être impliquée dans les effets protecteurs observés en réponse à la chymotrypsine. Il pourrait être judicieux d'utiliser l'antagoniste des CRACs (BTP2) dans nos expériences pour examiner l'implication de ces canaux calciques sur les effets transcriptionnels médiés par la chymotrypsine.

Une autre piste de réflexion intéressante à ce sujet pourrait être une coopération de PAR2 avec le récepteur TLR4. Ce récepteur membranaire de type PRR est exprimé par l'épithélium et les cellules immunitaires et reconnaît normalement les lipopolysaccharides de la paroi des bactéries. Plusieurs études ont cependant montré que ce récepteur pouvait aussi

être activé par des protéases comme l'élastase du neutrophile [333], [428]. De manière particulièrement intéressante, Nhu et collègues ont montré que la stimulation concomitante de TLR4 et de PAR2 chez des macrophages murins induisait une production d'IL-10 par ces cellules [429]. Il s'agit de la seule étude faisant le lien entre la signalisation de PAR2 et l'induction d'IL-10. Il est intéressant de noter que lors de notre première étude sur les organoïdes traités à la chymotrypsine, une augmentation de l'expression de TLR4 avait été observée. Etant donné l'importance de cette cytokine dans l'homéostasie intestinale, il pourrait être envisagé d'explorer l'implication de la coopération PAR2-TLR4 dans l'induction d'IL-10 en réponse à la chymotrypsine. Ceci pourrait être réalisé en stimulant des modèles cellulaires avec de la chymotrypsine en combinaison avec un antagoniste de TLR4.

En outre, afin d'éviter la dégradation du matrigel des organoïdes nous avons été contraints d'utiliser des doses relativement faibles de chymotrypsine auxquelles l'activation de PAR2 est difficile à détecter dans les CMT93 (pas de flux calcique à cette concentration, et limite de détection de l'activation de la voie ERK1/2). Ceci représente une limite importante à la détection des gènes modulés par la chymotrypsine via PAR2 dans le modèle organoïde, malgré les stimulations répétées que nous avons appliquées. L'utilisation de concentrations plus élevées de chymotrypsine dans d'autres modèles épithéliaux pourrait donc nous aider à mieux appréhender les conséquences fonctionnelles de l'activation de PAR2 par cette enzyme. Ce récepteur a en effet été associé à des effets pléiotropes vis-à-vis de l'épithélium. L'administration intra-colique d'agonistes de PAR2 chez la souris entraîne par exemple une augmentation de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium [313]. L'activation de PAR2 à la surface des cellules épithéliales intestinales a aussi été associée à l'activation de processus très variés tels que la prolifération cellulaire, le transport des ions chlorures ou encore la sécrétion de médiateurs immunitaires (CX-CL8, prostaglandines) [275], [290], [302], [317], [336]. Tous ces exemples représentent autant de fonctions qui pourraient être modulées par la chymotrypsine de par sa capacité à activer PAR2.

2.2. Quelles autres cibles cellulaires pour la chymotrypsine ?

Lors de notre étude nous avons dans un premier temps choisi de nous concentrer sur les effets potentiels de la chymotrypsine via PAR2. Il est cependant important de préciser que la plupart des effets transcriptionnels observés aux doses de chymotrypsine utilisées semblaient indépendants de l'activation de PAR2 et suggèrent ainsi d'autres cibles cellulaires pour la chymotrypsine à la surface des cellules épithéliales.

a) Effets potentiels du désarmage de PAR1

De manière intéressante, nos données montrent que la chymotrypsine désarme PAR1 bien plus efficacement qu'elle n'active PAR2. Cette dualité entre activation de PAR2 et désarmage de PAR1 confère à cette enzyme un profil unique parmi les protéases à activité de type « chymotrypsin-like » ayant été caractérisées jusqu'ici. L'élastase du neutrophile par exemple active de manière biaisée à la fois PAR1 et PAR2, alors que la cathepsine G et la protéinase-3 désarment ces deux récepteurs [233], [234].

Dans la littérature, l'activation de PAR1 à la surface des cellules épithéliales a été associée à de nombreux effets : stimulation du transport ionique, induction de la prolifération cellulaire dans des lignées épithéliales cancéreuses ou de l'apoptose cellulaire [291], [292], [314]. Chez des organoïdes coliques humains, notre équipe a aussi montré que la thrombine diminuait la prolifération et augmentait l'apoptose cellulaire via ce récepteur [294]. Cependant, contrairement à leur activation, les rôles physiologiques du désarmage des PARs ont été très peu étudiés. D'un point de vue biologique, la chymotrypsine pourrait être perçue comme un régulateur négatif de la signalisation de PAR1. En désarmant PAR1 elle pourrait donc avoir des effets anti-apoptotiques ou anti-prolifératifs sur les cellules épithéliales selon le contexte cellulaire observé. Sachant que l'épithélium intestinal produit de la thrombine [297], il pourrait être pertinent d'évaluer les effets de la chymotrypsine sur les fonctions épithéliales médiées par PAR1.

Jusqu'à présent nous avons concentré notre attention sur les deux grandes voies de signalisation majoritaires induites en aval des PARs : la signalisation calcique et ERK1/2. Nous sommes néanmoins conscients que d'autres voies de signalisation peuvent être activées via

ces récepteurs, comme la voie des Rho GTPases par exemple. Il serait donc important de compléter notre caractérisation pharmacologique en étudiant ces voies de signalisation.

b) Quid des récepteurs PAR3 et PAR4 ?

Lors de notre étude pharmacologique, nous n'avons pas été en mesure de mesurer le potentiel de la chymotrypsine pancréatique à cliver le récepteur PAR4. Il a été décrit que ce récepteur pouvait être activé par des protéases à activité de type chymotrypsique, comme la cathepsine G à la surface des plaquettes humaines [430], [431]. De plus, PAR4 est exprimé par l'épithélium colique humain et murin et pourrait donc représenter une cible potentielle pour la chymotrypsine [294], [295]. Comme exposé précédemment, notre équipe a montré que la thrombine favorisait la maturation d'organoïdes coliques humains et stimulait l'apoptose des cellules épithéliales [294]. Ces phénomènes étaient à la fois réduits par l'utilisation d'antagonistes de PAR1 mais aussi de PAR4. En plus de PAR2, il serait donc intéressant d'évaluer si les effets transcriptionnels de la chymotrypsine observés chez les organoïdes pourraient être modulés par des antagonistes pharmacologiques de PAR4.

Nous avons identifié que la chymotrypsine possédait la faculté de cliver le récepteur PAR3. Cette découverte est intéressante d'un point de vue pharmacologique car peu de protéases peuvent cliver ce récepteur hormis la thrombine, le facteur FXa, la PCa ou encore la trypsine et leur capacité à activer une signalisation aval est très discutée (Heuberger et Schuepbach 2019). Nos expériences préliminaires indiquent que le clivage de PAR3 par la chymotrypsine n'entraîne pas de signalisation calcique intracellulaire, ni d'activation de ERK1/2. Ces résultats sont en accord avec la publication ayant identifié historiquement PAR3 et dans laquelle les auteurs rapportaient que la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase ou encore la cathepsine G n'avaient aucun effet sur la signalisation calcique d'œufs de xénopes exprimant PAR3 de manière exogène [224]. La question des conséquences fonctionnelles du clivage que nous avons identifié reste donc entière.

A l'aide de peptides synthétiques dérivés de la séquence N-terminale de PAR3, De Bruyn et al. ont récemment argué que la cathepsine G, une protéase à activité de type chymotrypsique, pourrait désarmer ce récepteur [432]. La véracité de ce clivage n'a pas été confirmée dans un contexte cellulaire. Pour autant, la possibilité d'un désarmage de PAR3 par

les protéases de type « chymotrypsin-like » pourrait être en accord avec nos données et nécessiterait d'explorer le site de clivage tel que nous l'avons fait pour PAR1 et PAR2.

Même si sa signalisation directe demeure mystérieuse, ce récepteur semble intervenir de manière privilégiée comme cofacteur d'autres PARs en potentialisant ou réprimant la signalisation de PAR1 et PAR4 selon le contexte cellulaire étudié [241], [270], [433]. Il serait intéressant d'explorer si chez des cellules exprimant PAR3, une préexposition à la chymotrypsine module l'activation des autres PARs. Ceci pourrait être réalisé à partir de modèles d'expression endogène puisque notre équipe possède une lignée de souris déficientes pour PAR3, ou dans des modèles cellulaires simples de co-expression hétérologue des PARs.

Il faut toutefois rappeler qu'en condition physiologique les cellules exprimant PAR3 (afférences nerveuses, cellules endothéliales, immunitaires) sont probablement peu exposées à la chymotrypsine luminale du fait de la présence de la barrière épithéliale. La question de cette interaction est donc potentiellement plus pertinente en condition pathologique où la barrière épithéliale est lésée, comme cela peut être le cas dans des conditions inflammatoires comme les MICI.

c) Identification de nouvelles cibles de la chymotrypsine

En plus des PARs, les protéases peuvent cliver de nombreuses protéines cellulaires susceptibles d'avoir des effets directs ou indirects sur les fonctions cellulaires. Le développement des techniques de spectrométrie de masse permet à présent d'identifier et de quantifier le clivage de peptides cellulaires par une protéase donnée au sein de mélanges protéiques complexes [434], [435]. Nous pourrions utiliser ce type d'approche pour étudier les produits de clivage dans des surnageants de cellules épithéliales exposées à la chymotrypsine. Ceci pourrait nous permettre d'identifier de nouvelles cibles cellulaires de la chymotrypsine, présentes à la surface de l'épithélium intestinal.

3. L'exploration *in vivo* pour mieux caractériser la fonction physiologique de la chymotrypsine

L'utilisation des organoïdes s'est avérée précieuse en tant que première approche lors de nos travaux. Il s'agit effectivement de l'un des seuls modèles permettant d'étudier le compartiment épithélial de manière isolée, tout en conservant une organisation structurale et une diversité cellulaire qui se rapprochent d'un épithélium physiologique. De plus, il s'agissait de primo-cultures d'origine humaine, qui nous permettaient d'être au plus proche de la physiologie intestinale chez l'Homme.

Cependant, il possède aussi certaines limites pour notre étude comme l'impossibilité d'accéder au pôle apical des cellules épithéliales, ayant déjà été discuté dans la partie 2 des résultats. Il ne permet également pas de récapituler la complexité du microenvironnement épithélial *in vivo* (microbiote, mésenchyme, système immunitaire, nerveux...) qui pourrait contrebalancer les effets de la chymotrypsine. Enfin, nous avons focalisé notre étude sur des organoïdes de colon, un modèle couramment utilisé et ayant été bien caractérisé au sein de notre laboratoire. Néanmoins, nous savons que l'activité chymotrypsique est plus haute dans la lumière de l'intestin grêle par rapport au colon. Il serait donc tout à fait pertinent d'explorer les effets de la chymotrypsine sur l'épithélium de l'intestin grêle.

Afin de pallier les limites des modèles évoqués précédemment il sera donc nécessaire de poursuivre l'exploration des rôles de la chymotrypsine *in vivo*. Une perspective très intéressante dans cette voie serait d'utiliser des souris génétiquement déficientes en chymotrypsine. Ce type d'animaux a été développé par l'équipe du Dr. Miklos Sahin-Toth (UCLA, USA) pour étudier le rôle des chymotrypsines pancréatiques dans la pancréatite. D'après leurs travaux, les souris *Ctrb1*-KO sont viables, présentent un gain de poids normal, aucun phénotype pathologique apparent et une morphologie pancréatique inchangée [364]. Cependant, la physiologie intestinale de ces animaux reste à caractériser. Une collaboration avec cette équipe américaine devrait nous permettre d'acquérir, dans le futur, des animaux de cette lignée au sein de notre zootechnie et, idéalement, le développement futur d'une lignée KO inductible serait optimal.

L'étude des souris *Ctrb1*-KO pourrait donc nous permettre de disséquer plus précisément les rôles de la chymotrypsine dans l'homéostasie intestinale.

d) Perspective additionnelle : la chymotrypsine pourrait-elle modeler le microbiote intestinal ?

Lors de ce projet nous avons choisi d'illustrer l'intérêt d'une protéase pancréatique telle que la chymotrypsine en nous focalisant d'abord sur ses interactions avec la muqueuse de l'hôte. Cependant, nous pouvons imaginer que la présence abondante de cette enzyme dans la lumière intestinale pourrait aussi moduler d'autres composantes de l'environnement intestinal.

Certaines données de la littérature pointent notamment des propriétés antimicrobiennes intéressantes de la chymotrypsine. *In vitro*, Zhou et collègues ont montré que l'ajout de cette protéase dans le milieu de culture de bactéries commensales telles que *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* réduisait significativement leur croissance [436]. Dans une autre étude Cattò *et al.* ont établi que de la chymotrypsine active immobilisée sur un support de plastique inerte prévenait l'implantation de biofilms d'*Escherichia coli* en déstabilisant leur matrice extracellulaire [437]. Des travaux de notre équipe ont aussi montré l'impact des protéases, notamment de la thrombine, sur l'organisation et les propriétés du microbiote intestinal [297], [318].

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la chymotrypsine pourrait influencer la composition mais aussi la structure des communautés microbiennes présentes dans la lumière intestinale. A ce titre, l'étude de souris déficientes en chymotrypsine représenterait donc aussi une opportunité intéressante pour explorer le rôle de cette enzyme dans la régulation des populations microbiennes du tractus digestif.

4. La chymotrypsine, une nouvelle protéase épithéliale ?

Au cours de ces dernières années, l'épithélium intestinal s'est imposé comme une source inattendue de protéases sécrétées comme la thrombine, l'élastase 2 ou la trypsine 3 [208], [297], [298], [317]. Une étude datant de la fin des années 1990, a fait état d'une possible expression de la forme B de la chymotrypsine (CTRB) par des cellules de l'épithélium gastrique et intestinal chez le rat [382].

L'un des résultats majeurs de notre étude est la découverte de la présence de CTB dans l'épithélium de l'estomac murin et humain. Cette expression est localisée à la base des glandes gastriques et est caractérisée par un aspect granuleux, évoquant des granules de sécrétions. Chez la souris, ce marquage est colocalisé avec le pepsinogène, une protéase digestive produite par les cellules principales des glandes gastriques, suggérant que ce type cellulaire est à l'origine de l'expression gastrique de la CTB. Nos résultats présentent un lien intéressant avec l'étude de Kallio *et al.* qui a caractérisé le transcriptome de l'estomac de souris délétées pour le gène de l'anhydrase carbonique (*Car9^{-/-}*) [438]. La délétion de cette enzyme impliquée dans le métabolisme du bicarbonate entraîne une déplétion des cellules principales de l'estomac chez la souris. Dans le jeu de données transcriptomiques de cette étude, la déplétion des cellules principales était associée à une diminution significative de l'expression du gène *Ctrb1*, rajoutant du crédit à nos observations. Une question majeure apparaît donc à la lumière de ces éléments : **Quel pourrait être le rôle de cette protéase au sein de l'épithélium gastrique ?**

Les cellules principales de l'estomac sont connues pour sécréter des enzymes digestives telles que la pepsine ou la lipase pancréatique. La CTB est initialement connue comme une enzyme digestive et son précurseur contient un peptide signal qui prédit sa sécrétion. Une première hypothèse pourrait être que cette enzyme soit sécrétée dans la lumière gastrique en même temps que la pepsine, afin de participer à la digestion du chyme alimentaire. Cette piste est cependant peu probable car le pH luminal très acide de l'estomac ($\text{pH} < 3$) ne paraît pas compatible avec le pH optimal d'activité de la CTB, se situant entre 7-8. De plus, les sécrétions acides de l'estomac sont connues pour inactiver les enzymes pancréatiques [439]. En revanche, les glandes gastriques et la surface de l'épithélium sont recouvertes de mucus contenant du bicarbonate qui tamponne l'acidité luminale et préserve l'intégrité du tissu [440]. L'environnement proche muqueuse pourrait donc être plus propice à l'activité de la CTB où elle pourrait par exemple agir dans la maturation des peptides sécrétés ou la défense de l'hôte contre certains pathogènes. De manière intéressante, PAR2 est exprimé par les cellules principales de l'estomac et sa stimulation promeut la sécrétion de pepsine par ces cellules [441]. Un rôle autocrine de la CTB pourrait donc aussi être envisagé.

Par ailleurs, Miao *et al.* ont rapporté avoir identifié la présence de CTB au sein de lysosomes dans des hépatocytes de rat [442]. Les auteurs ont décrit que la chymotrypsine

contribuerait au processus de mort cellulaire en clivant le facteur pro-apoptotique Bid. Lors de nos analyses nous n'avons cependant pas détecté d'expression de la CTRB dans le foie des souris WT (données non montrées). Ces données suggèrent toutefois qu'un potentiel rôle intracellulaire de la CTRB gastrique n'est pas à exclure.

A long terme, l'étude du rôle de la CTRB dans les cellules principales de l'estomac pourrait nécessiter un modèle de souris permettant une délétion spécifique du gène *Ctrb1* dans ce type cellulaire. Pour cela, nous pourrions avoir recours à des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du pepsinogène qui permet d'induire une délétion génétique spécifiquement dans les cellules principales, comme décrit par Ying et al. [443]. Grâce à ce type de modèle nous pourrions d'une part confirmer la source cellulaire de chymotrypsine dans l'estomac, mais aussi étudier les conséquences de la déplétion de la CTRB dans la physiologie gastrique.

5. Implications de l'activité chymotrypsique dans la physiopathologie des MICI ?

Au cours de ce manuscrit nous avons illustré à plusieurs reprises que les protéases assurent des rôles physiologiques importants, mais qu'une dérégulation de l'activité de certaines d'entre elles participe aux mécanismes physiopathologiques des MICI. En ce sens, l'absence de données claires à son sujet nous a amenés à nous intéresser à la régulation de la chymotrypsine dans ces pathologies.

L'accès à une bio-collection humaine nous a permis d'identifier que l'activité chymotrypsique était augmentée d'un facteur 5 dans des fèces de patients souffrant de MICI en comparaison à des donneurs sains. De manière inattendue, parmi toutes les activités protéolytiques mesurées sur ces échantillons, l'activité chymotrypsique était la plus fortement augmentée chez les patients MICI (données du laboratoire). En effet, seule l'activité élastolytique était aussi augmentée d'un facteur 2,4 alors que les activités de type trypsine et thrombine ne différaient pas des contrôles. De plus, mes travaux montrent que l'activité chymotrypsique était plus forte chez les patients comportant une maladie cliniquement active comparé aux patients en rémission. Ceci suggère donc que l'activité chymotrypsique pourrait être directement impliquée dans les processus inflammatoires des MICI. Néanmoins, ces

données ne nous permettent pas de relier directement l'augmentation d'activité observée aux formes de chymotrypsines pancréatiques, dû au manque de spécificité des substrats disponibles actuellement.

Il est tout de même intéressant de mettre nos résultats en perspective avec des données récentes de la littérature qui pointent l'importance des protéases pancréatiques dans la physiopathologie des troubles intestinaux. En condition physiologique, il semble en effet que ces protéases subissent une forte inactivation dans le colon, en partie due à la présence du microbiote [374]. Yoon *et al.* ont montré que des patients atteints de MICI et placés sous antibiothérapie présentaient une forte augmentation d'activité protéolytique fécale globale comparé à l'activité dosée avant antibiothérapie [381]. Le même traitement administré à des souris a permis de voir que cette activité élevée était majoritairement due à des enzymes pancréatiques (dont la CTB). Cette suractivité entraînait une perméabilité intestinale accrue chez les souris et était directement associée à une déplétion du microbiote dont certaines espèces non identifiées pourraient être responsables de l'inactivation de ces enzymes à l'état physiologique. Cependant, aucune étude n'a spécifiquement exploré les activités d'origine pancréatique chez les patients atteints de MICI. En ce sens, une étude très récente a identifié par une approche protéomique qu'un taux élevé de chymotrypsine C (CTRC) fécale était parfaitement corrélé à la sévérité de l'inflammation dans les MICI [444]. Il s'agit de la première étude à associer directement une chymotrypsine d'origine pancréatique avec ce type de pathologies. Afin d'explorer cette piste, notre étude préliminaire sera poursuivie par des analyses de Western-blot visant à quantifier les formes majoritaires de chymotrypsines pancréatiques, dans les échantillons de notre bio-collection.

Nous avons précédemment émis l'hypothèse qu'en condition physiologique, la chymotrypsine pancréatique pourrait avoir un rôle protecteur et immunomodulateur vis-à-vis de l'épithélium intestinal. Au vu des résultats discutés ici, il sera nécessaire d'explorer les rôles précis de la chymotrypsine dans les MICI en utilisant des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale. Chez la souris, l'un des modèles les plus utilisés pour mimer les atteintes retrouvées lors des MICI est l'administration de Sodium Dextran Sulfate (DSS) pendant sept jours dans l'eau de boisson. **Dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer l'intérêt d'apports exogènes de chymotrypsine dans le modèle de colite au DSS en**

pratiquant des administrations intra-coliques de cette enzyme chez des souris WT, de manière à estimer son impact sur le contrôle de l'inflammation.

Dans un deuxième temps, il serait pertinent d'évaluer l'effet de la chymotrypsine endogène dans l'inflammation en utilisant le modèle DSS chez des souris *Ctrb1*-KO et comparer leur phénotype par rapport à des souris WT.

Enfin, la cicatrisation complète de la muqueuse intestinale est un marqueur pronostic durable de rémission des MICI et constitue à l'heure actuelle l'un des objectifs cliniques principaux [445]. Afin d'apprécier le potentiel de la chymotrypsine à accélérer ou non la réparation de la muqueuse, il serait aussi judicieux d'observer ses effets après la phase de DSS chez les souris, période à laquelle les mécanismes de réparation tissulaire se mettent en place.

5.1. Implications potentielles des activités chymotrypsiques dans d'autres contextes pathologiques : le syndrome de l'intestin irritable ?

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est l'un des troubles gastro-intestinaux chroniques les plus courants et pourrait toucher plus de 10% de la population dans les pays développés [446]. Il est caractérisé par plusieurs symptômes digestifs incluant des douleurs abdominales des ballonnements qui peuvent être associés ou non à des épisodes de diarrhée ou de constipation. Il s'agit d'un trouble dit « fonctionnel » car aucune anomalie tissulaire n'est détectée par les examens cliniques classiques (endoscopie, échographie). Les causes de cette pathologie sont encore mal comprises mais un niveau de preuves croissant pointe l'existence d'une inflammation de bas grade, associée à une perméabilité intestinale augmentée, des troubles de la motricité intestinale et une hypersensibilité viscérale chez les patients atteints de SII [447]. Les protéases semblent être des protagonistes importants dans la physiopathologie du SII [403]. Plusieurs études ont ainsi montré un niveau d'activité protéolytique augmentée dans les fèces de patients atteints de SII [448], [449]. Dans ces travaux, l'administration de surnageants fécaux issus de patients chez des souris était respectivement responsable d'une rupture de la perméabilité intestinale, ainsi que d'une sensibilité viscérale anormalement élevée. De manière intéressante, Edogawa *et al.* ont montré qu'au sein des activités protéolytiques augmentées dans les fèces de patients SII, les

activités de type chymotrypsine étaient parmi les plus dérégulées [450]. Dans cette étude, les surnageants fécaux issus de patients présentant une forte activité protéolytique générale augmentaient la perméabilité paracellulaire de monocouches cellulaires épithéliales (Caco-2), de manière dépendante de PAR2 [450]. Une importante activité chymotrypsique fécale chez des patients atteints de SII a récemment été confirmée par une seconde étude du même groupe, dans laquelle l'activité protéolytique augmentée était associée à une diminution de microorganismes producteurs de bilirubine, un métabolite ayant une activité inhibitrice des protéases [451].

Ensemble, ces données de la littérature suggèrent que l'intérêt d'étudier la régulation des chymotrypsines en condition pathologique ne se limite pas uniquement aux MICI.

Conclusion générale

La lumière intestinale est le siège d'interactions multiples et finement régulées entre le bol alimentaire, les microorganismes résidents et la muqueuse de l'hôte. Au sein de cet environnement complexe les protéases assurent des fonctions physiologiques importantes. Le projet décrit au cours de ce manuscrit avait pour vocation de caractériser le rôle de la chymotrypsine, une protéase pancréatique abondamment retrouvée dans la lumière intestinale, dans l'homéostasie de la barrière intestinale.

Ayant détecté la présence de chymotrypsine active au voisinage de la muqueuse colique, j'ai pu montrer que même à faible concentration, cette enzyme était capable de réguler l'expression génique des cellules épithéliales dans des organoïdes de colon humain. De par ces résultats, nous émettons l'hypothèse qu'en condition physiologique, cette enzyme pourrait représenter un signal bénéfique pour l'épithélium intestinal en promouvant l'expression de gènes importants pour le maintien de l'homéostasie épithéliale tels que *LGR5*, *MUC2* et *IL10*.

Par ailleurs, mes travaux ont permis de mettre pour la première fois en évidence la capacité de la chymotrypsine à moduler la signalisation des cellules épithéliales intestinales en activant le récepteur PAR2 et mes résultats suggèrent que cette signalisation pourrait induire l'expression de *IL10* dans le modèle organoïde. De plus, nous avons aussi découvert que cette enzyme clive le récepteur PAR1 à la surface des cellules épithéliales intestinales en le désarmant, ce qui empêche son activation ultérieure par la thrombine. Ces données appuient l'idée que la chymotrypsine pourrait réguler des fonctions épithéliales importantes, puisque l'activation de PAR1 a notamment été associée à des effets pro-apoptotiques ou pro-prolifératifs vis-à-vis de l'épithélium intestinal. Pour aller plus loin dans la compréhension des effets biologiques de la chymotrypsine des études *in vivo* seront nécessaires. L'utilisation de souris génétiquement délétées pour le gène de la CTRB pourrait représenter un modèle de choix dans cette voie.

En dehors du pancréas, mes résultats ont aussi permis de montrer que la CTRB pourrait être exprimée par les cellules principales des glandes gastriques humaines et murines. De plus, nos données préliminaires suggèrent une expression transcriptionnelle de la CTRL, une isoenzyme chymotrypsique dont les rôles physiologiques sont inconnus, par la muqueuse intestinale humaine. Ces découvertes ouvrent la voie à de nouvelles fonctions potentielles

pour cette enzyme au sein même des épithéliums digestifs, qui devront être explorées dans la suite de ce projet.

En dehors de ses fonctions physiologiques potentielles, nous avons aussi identifié que l'activité chymotrypsique est fortement augmentée dans les fèces de patients atteints de MICI. D'autres protéases retrouvées en condition inflammatoire possèdent une activité de type chymotrypsine. A la lumière de nos résultats *in vitro*, il sera donc nécessaire d'examiner plus précisément si la chymotrypsine pancréatique est à l'origine de cette activité dérégulée et si cette augmentation potentielle est associée à des effets délétères lors des MICI ou au contraire à la mise en place de mécanismes protecteurs de la muqueuse.

Pour conclure, ce projet a donc permis d'identifier des fonctions jusqu'ici inconnues de la chymotrypsine, allant bien au-delà de ses rôles digestifs, et s'inscrivant comme un nouvel acteur de la signalisation protéolytique dans l'intestin. Par ces travaux, j'ai ainsi pu apporter une nouvelle illustration de l'importance des protéases dans l'homéostasie du tissu intestinal.

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Curriculum vitae

Annexe 2 : Poster présenté lors du Banff Inflammation Workshop 2023

Annexe 3 : Prix de la communication orale obtenu lors du 15^{ème} World Congress on Inflammation 2022

Annexe 4 : Publication issue de travaux collaboratifs, “Involvement of CATSPER 2 mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization failure associated with hypoacusis: a case report”.

Simon GUIGNARD

Ph.D. Student

Digestive Health Research Institute – INSERM U1220 - CHU Purpan - BP 3028 31024 -Toulouse Cedex 3 - France

PERSONAL INFORMATIONS

Status : childless

Phone : 06 86 32 99 09

Birth Date : 02/19/1996 › 27
years

E-mail : simon.guignard@inserm.fr

EDUCATION AND DIPLOMAS

- 2022** **European qualification in animal experimentation, level B (project designer)** - National Veterinary School, Toulouse, France
- 2017-2019** **Master degree (M.Sc.) in Biology, Biotechnology and Therapeutic Research**
- University of Nantes, France
- 2016-2017** **Bachelor degree (B.Sc.) in Biochemistry** - University of La Rochelle, France
- 2014-2016** **Associate degree in bioanalysis (Microbiology, Biochemistry, Molecular Biology)** - University of La Rochelle, France

RESEARCH EXPERIENCE AND INTERNSHIPS

- 2019-2023** **Ph.D. student in Physiopathology and Cell Biology** - Digestive Health Research Institute (INSERM IRSD U1220), University of Toulouse, France
- Team 1 : « Gut Protease Signals » (N. VERGNOLLE – C. DERAISON)
- Title : « Function of chymotrypsin in the homeostasis of the intestinal barrier »**
(Supervisors: Céline DERAISON, Chrystelle BONNART)
- Analysis of the pharmacology and signalling of Proteinase-Activated Receptors (cleavage assay, calcium mobilization assay, WB, DRG neurons isolation and culture)
 - Characterization of 3D primary organoids culture and 2D intestinal epithelial cell lines (morphological monitoring, RT-qPCR, IF, permeability assay)
 - Study of the regulation of chymotrypsin in physiological and pathological conditions using murine models and human samples (enzymatic activity assay, IHC, WB, RT-PCR)
- 2018-2019** **Master internships (2 and 6 months)** - Team: pathophysiology of nutritional adaptations (UMR INRAE 1280), University of Nantes, France
- Title : « Impact of maternal protein restriction on hypothalamic neural stem cells in rats »**
(Supervisor: Valérie AMARGER)
- Development and characterization of a primary culture model of murine neural stem cells (cell culture, RT-qPCR, IF, proliferation test)

TEACHING ACTIVITIES

- 2021-2022** 32h - Sessional lecturer in Cell Biology (undergraduate B.Sc. Biology students) - University of Toulouse, France
- 2020-2021** 32h - Sessional lecturer in Cell Biology (undergraduate B.Sc. Biology students) - University of Toulouse, France


FUNDING

- 2022** 4th year thesis funding grant from the French Foundation for Medical Research (FRM)

SUPERVISION

- 2022** M.Sc. student (Omblin SEGUIN)

COMMUNICATIONS

- 2023** Poster presentation at the international congress : “Banff Inflammation Workshop 2023” - Calgary, Canada
- 2022** Oral presentation at the international congress : “15th World Congress on Inflammation” - Roma, Italy
-  **Communication Award**
Title: « Chymotrypsin Activity Signals to Intestinal Epithelial Cells »
- 2022** Oral presentation at the national congress : « 39th CECED meeting (Digestive Epithelial Cell Study Club) » - Lyon
- 2021** Oral presentation at the European congress : « The United European Gastroenterology (UEG) Week »
- 2021** Oral presentation at the international congress : « Serine Proteases in Pericellular Proteolysis and Signalling » (ASBMB)

SCIENCE POPULARIZATION

- 2019** Participation in the « Déclics » project - Meeting between researchers and high school students from Toulouse, France

PUBLICATION (from the Master's internship)

Frapin M, **Guignard S**, Meistermann D, Grit I, Moullé VS, Paillé V, Parnet P, Amarger V. *Maternal Protein Restriction in Rats Alters the Expression of Genes Involved in Mitochondrial Metabolism and Epitranscriptomics in Fetal Hypothalamus*. *Nutrients*. 2020; 12(5):1464.

Chymotrypsin: a new player in proteolytic signaling in intestinal epithelial cells

Simon GUNGNARD¹, David SAGNAT¹, Corinne ROLLAND¹, Mahmoud Saïfeddine², Koichiro Mihara², Mouna Ambli², Céline DERAISON², Morley D. Hollenberg², Nathalie VERGNOLLE¹, and Chrystelle BONNART¹

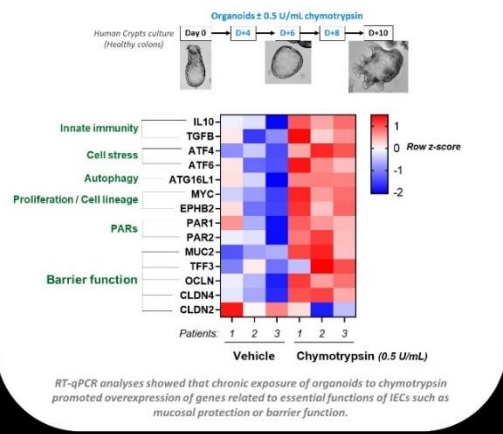
¹Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), INSERM, INRA, ENVT, UPS, Université de Toulouse, Toulouse, France
²Departments of Physiology & Pharmacology, and Medicine, University of Calgary Cumming School of Medicine, 3330 Hospital Drive NW, Calgary, Ab T2N 4N1, Canada.

In the gut, the epithelium is exposed to a wide variety of proteolytic enzymes that ensure many physiological functions. A key molecular target of proteases on cells are unusual GPCR called "PARs" (Protease-Activated Receptors) whose activation regulates many physiological and pathophysiological processes. PARs mediate intracellular signalling pathways following the proteolytic cleavage of their N-terminal extracellular extremity. Two members of this family, PAR1 and PAR2, are highly expressed in intestinal epithelial cells (IECs) at both basal and apical sites, making them easily accessible to luminal proteases.

Among the luminal proteases, chymotrypsin is a pancreatic enzyme that is secreted into the duodenum and involved in food digestion. Chymotrypsin activity is found all along the small and large intestine. Although its function in food degradation have been well established, how chymotrypsin could influence the intestinal epithelium especially through cleavage of PAR1 or PAR2 has never been studied.

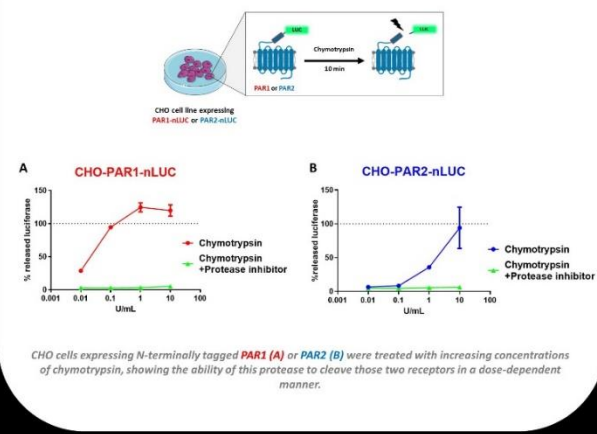
Part 1: What are the effects of chymotrypsin on IECs?

1. Chymotrypsin changes expression of genes involved in major functions of IECs

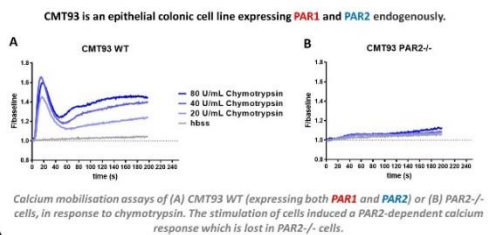


Part 2: Is chymotrypsin activity able to signal to IECs through PAR1 and PAR2?

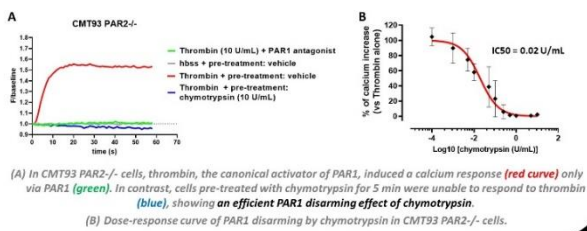
2.1. Chymotrypsin cleaves the extracellular domains of PAR1 and PAR2



2.2. Chymotrypsin activates calcium signaling in IECs, exclusively via PAR2



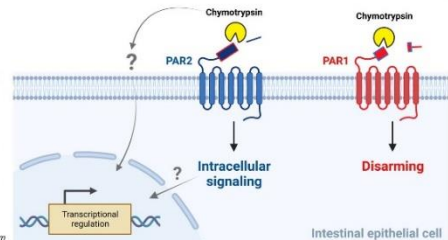
2.3. Chymotrypsin disarms PAR1 for further activation by thrombin (its canonical activator)



Conclusion

This work highlights unknown function of chymotrypsin that goes well beyond a simple digestive role. Our results showed the ability of chymotrypsin to cleave both PAR1 and PAR2, two GPCR expressed at the surface of IECs. In colonic cells, while chymotrypsin activated intracellular signaling specifically via PAR2, it disarmed PAR1, preventing further activation by its canonical agonist: thrombin.

Moreover, in intestinal organoids, we observed that chymotrypsin promoted a protective transcriptional profile, suggesting beneficial effects in the maintenance of epithelial homeostasis. Although the underlying mechanisms remain to be elucidated, experiments are ongoing to clarify the involvement of PARs in these effects.



Oral Communication Award

To

SIMON GUIGNARD

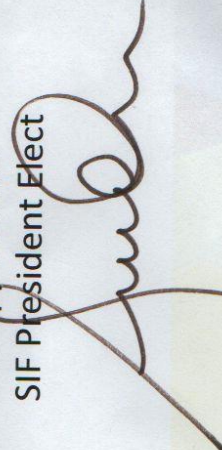
Giorgio Racagni
SIF President



Natalie Vergnolle
IAIS President



Giuseppe Cirino
SIF President Elect



15th World Congress
on Inflammation
New Frontiers in Inflammation:
from Translational Research to Clinic

June 5th-8th **Rome**
2022
Egipe Hotel Palace

Publication issue de travaux collaboratifs

Involvement of CATSPER 2 mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization failure associated with hypoacusis: a case report

Préambule :

Dans le cadre de l'étude de la signalisation des PARs dans le cadre du projet sur la chymotrypsine, j'ai développé une expertise technique importante dans la mesure du flux calcique intracellulaire. Fort de cette compétence, un clinicien collaborateur de mon équipe d'accueil m'a sollicité pour mettre en place l'analyse du flux calcique sur spermatozoïdes humains dans le cadre d'une étude sur l'infertilité masculine. Ces travaux ont permis d'avancer dans la compréhension d'un cas clinique d'infertilité masculine inexplicée et ont conduit à la rédaction d'un article de type Case Report soumis dans le journal Fertility and Sterility Reports en Août 2023, article pour lequel je suis en premier auteur.

F&S Reports

Involvement of CATSPER 2 mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization failure associated with hypoacusis: a case report. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	XFRE-D-23-00188
Full Title:	Involvement of CATSPER 2 mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization failure associated with hypoacusis: a case report.
Short Title:	CATSPER2-associated infertility: a case report
Article Type:	Case Report
Keywords:	CATSPER; Fertilization; hypoacusis; Spermatozoa; Calcium channel
Corresponding Author:	Nicolas GATIMEL Paule de Viguier Hospital TOULOUSE, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Paule de Viguier Hospital
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Simon Guignard, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Simon Guignard, PhD Christina Guillaume, MD Laurie Tornero, MD Jessika Moreau, MD Manon Carles, Pharm D François Isus, MD Éric Huyghe, MD, PhD Célia Ravel, MD, PhD Nathalie Vergnolle, PhD Céline Deraison, PhD Chrystelle Bonnard, PhD Nicolas GATIMEL
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	Objective: To explore the functional implications of a homozygous CATSPER 2 deletion within the acrosome reaction pathway during fertilization in two brothers, who have unexplained infertility and hypoacusis. Design: Case report. Subjects: Two twin brothers aged 30 years with hypoacusis and unexplained infertility. Exposure or intervention: Molecular genetic diagnosis of deafness. Evaluation of the acrosome reaction and calcium mobilization assays after induction by Progesterone and Ionomycin on spermatozoa of the CATSPER2 mutated patient and on fertile controls. Main Outcome Measures: Conventional sperm parameters. Fertilization rate during conventional IVF. Molecular genetic test. Percentage of acrosome reacted spermatozoa with PNA lectin staining. Recording of progesterone and ionomycin-

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>induced intracellular calcium signals with fluorescent probe.</p> <p>Results: Patient S and his brother have normal conventional sperm parameters. Both brothers have repeated intrauterine insemination failures with their partner and one fertilization failure after conventional IVF. One of them (Patient S) obtained 2 healthy babies after ICSI. Genetic analysis found a homozygote deletion of STRC gene (NM 153700: c.1-? 5328+?del) that removes the CATSPER 2 gene. Mutation in STRC gene is known to be associated in hypoacosis. Sperm functional tests revealed a complete inability of progesterone to activate intracellular calcium signaling and to induce acrosome reaction.</p> <p>Conclusion: We demonstrate the absence of a calcium signal and acrosome reaction after induction with progesterone in our CATSPER2 mutated patient. We emphasize the importance of the male medical interview and of the genetic investigation of hypoacosis. We show the necessity of IVF-ICSI even with normal sperm parameters.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Tao Luo Institut of Life Sciences, Nanchang, China zengxuhui@ncu.edu.cn Has worked a lot on this topic</p>
Opposed Reviewers:	



Hôpital Paule de Viguier



BIOLOGY AND MEDICINE OF DEVELOPMENT AND REPRODUCTION, MEDICAL GYNAECOLOGY

FACULTIES OF MEDICINE TOULOUSE
PURPAN AND TOULOUSE RANGUEIL
DEVELOPMENTAL AND REPRODUCTIVE
BIOLOGY AND MEDICINE, AND
GYNAECOLOGY
University Professor - Hospital
Practitioner:
Louis Bujan
Roger Léandri
Jean Parinaud
University Lecturer - Hospital
Practitioner:
Nicolas Gatimel

Toulouse, July 13th, 2023

To Professor Kurt T. Barnhart,
Editor-in-Chief
Fertility and Sterility

Dear Editor-in-Chief,

Please find enclosed our manuscript entitled “*Involvement of CATSPER2 mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization failure associated with hypoacusis: a case report.*” by Simon Guignard, Christina Guillaume, Laurie Tornero, Jessika Moreau, Manon Carles, François Isus, Éric Huyghe, Célia Ravel, Nathalie Vergnolle, Céline Deraison, Chrystelle Bonnard, Nicolas Gatimel.

We report the case of twin brothers, suffering from unexplained infertility, for whom a misdiagnosis led to inappropriate management by intra-uterine insemination and conventional IVF. After the description of the clinical and biological background, the aim of our work was to explain the pathophysiology of infertility in these brothers with unexplained infertility associated with hypoacusis, assessing the functional impact of a homozygous deletion of *CATSPER2* via acrosome reaction and intracellular calcium response induced by two different stimuli: progesterone and ionomycin.

This work led to a better understanding of certain cases of idiopathic male infertility. It allowed us to show the link between the *CATSPER2* mutation, the functional deficit of the calcium channels inducing a lack of acrosome reaction, infertility and numerous failure ART attempts (IUI and IVF) before turning to ICSI. We emphasize the importance of the male medical interview often neglected in the infertility assessment of a couple and the importance of the genetic investigation of hypoacusis. We show the necessity of managing these infertilities from the outset in IVF-ICSI even with normal sperm parameters. The special feature of this study relates to the small number of cases described in the literature. As far as we know, only one other case of *CATSPER2* mutation linked to idiopathic infertility has been reported to date. Clinical testing does not currently carry out a detection of *CATSPER* abnormalities. *CATSPER* abnormalities may therefore represent an underdiagnosed cause of male infertility.

We thank you in advance for giving this case report your careful consideration and we hope that you will agree to consider it for publication in your journal.

Yours sincerely,

Dr. Nicolas Gatimel

Service de Médecine de la Reproduction (Department of Reproductive Medicine), Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse, 330 avenue de Grande Bretagne, 31059 Toulouse Cedex 9 Tel. (0033)567771102 gatimel.n@chu-toulouse.fr
The material contained in the manuscript has not been published or submitted, and is not being submitted elsewhere for publication.
All authors approved the manuscript and agree to its submission.

1 **Running Title:** CATSPER 2-associated infertility: a case report
2
3 **Article Title:**
4 Involvement of *CATSPER 2* mutation in a familial context of unexplained infertility and fertilization
5 failure associated with hypoacusis: a case report.
6
7
8
9
10 7 Simon Guignard¹, PhD
11 8 Christina Guillaume², MD
12 9 Laurie Tornero^{1,2}, MD
13 10 Jessika Moreau^{2,3} MD
14 11 Manon Carles^{2,4}, Pharm D
15 12 François Isus², MD
16 13 Éric Huyghe^{2,4} MD, PhD
17 14 Célia Ravel MD⁵, PhD
18 15 Nathalie Vergnolle¹ PhD
19 16 Céline Deraison¹ PhD
20 17 Chrystelle Bonnard¹ PhD
21 18 Nicolas Gatimel^{1,2,4} PharmD, PhD
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32 1¹ IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, Univ Toulouse III - Paul Sabatier (UPS),
33
34 Toulouse, France
35
36 2²Department of Reproductive Medicine, Paule de Viguier Hospital, Toulouse Teaching Hospital
37
38 Group, 330 avenue de Grande Bretagne, 31059 Toulouse, France
39
40 3³Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-
41
42 Purpan, UPS, Toulouse, France.
43
44 4⁴DEFE (Développement Embryonnaire, Fertilité, Environnement - Embryonic Development,
45
46 Fertility, Environment), UMR1203, INSERM-Universities of Toulouse and Montpellier, Paule de
47
48 Viguier Hospital, 330 avenue de Grande Bretagne, 31059 Toulouse, France
49
50 5⁵Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé,
51
52 environnement et travail) -UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France
53
54
55
56
57 **Corresponding Author:** Dr Nicolas Gatimel, gatimel.n@chu-toulouse.fr
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

37 **Funding Statement:** DEFE and IRSD unit funding for materials, consumables and reagents.
1
2 38 The doctoral salary of S.G was supported by Medical Research Foundation (FRM -
3 39 FDT202204014931) and the National Research Institute for agriculture, feed and environment
4 40 (INRAE).
5
6 41
7
8 42 **Disclosure Statement:**
9
10 43 The authors declare that they have no actual or potential conflict of interest to disclose.
11 44
12
13 45 **Attestation Statement:** Data in the study has not been previously published unless
14 46 specified. Data will be made available to the editors of the journal for review or query
15 47 upon request.
16
17 48
18
19 49 **Word Count:** 329 words for abstract and 3087 words for text
20
21 50
22
23 51 **Trial registration:** Not applicable.
24
25 52
26
27 53 **Summary:** In brothers with unexplained infertility associated with hypoacusis, homozygous
28 54 deletion of CATSPER2 was associated with absence of a calcium signal, decrease in the
29 55 acrosome reaction after progesterone and fertilization failure.
30
31
32
33 56
34
35
36 57
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Objective: To explore the functional implications of a homozygous *CATSPER 2* deletion within the acrosome reaction pathway during fertilization in two brothers, who have unexplained infertility and hypoacusis.

Design: Case report.

Subjects: Two twin brothers aged 30 years with hypoacusis and unexplained infertility.

Exposure or intervention: Molecular genetic diagnosis of deafness. Evaluation of the acrosome reaction and calcium mobilization assays after induction by Progesterone and Ionomycin on spermatozoa of the *CATSPER 2* mutated patient and on fertile controls.

Main Outcome Measures: Conventional sperm parameters. Fertilization rate during conventional IVF. Molecular genetic test. Percentage of acrosome reacted spermatozoa with PNA lectin staining. Recording of progesterone and ionomycin-induced intracellular calcium signals with fluorescent probe.

Results: Patient S and his brother have normal conventional sperm parameters. Both brothers have repeated intrauterine insemination failures with their partner and one fertilization failure after conventional IVF. One of them (Patient S) obtained 2 healthy babies after ICSI. Genetic analysis found a homozygote deletion of *STRC* gene (NM 153700: c.1-? 5328+?del) that removes the *CATSPER 2* gene. Mutation in *STRC* gene is known to be associated in hypoacusis. Sperm functional tests revealed a complete inability of progesterone to activate intracellular calcium signaling and to induce acrosome reaction.

Conclusion: We demonstrate the absence of a calcium signal and acrosome reaction after induction with progesterone in our *CATSPER 2* mutated patient. We emphasize the importance of the male medical interview and of the genetic investigation of hypoacusis. We show the necessity of IVF-ICSI even with normal sperm parameters.

Keywords: *CATSPER*, fertilization, hypoacusis, spermatozoa, calcium channel, case report

91 **Introduction**

1 92 Unexplained infertility is a trouble with high incidence (10 à 25%) that can be attributed to
2
3 93 both male or female factors (1). Some of these unexplained infertilities are caused relating to
4
5 94 spermatozoa defects, which are often infrequently or poorly explored. The lack of a clear cause
6
7 95 for infertility in a couple, combined with the lengthy treatment involved in Assisted Reproductive
8
9 96 Techniques (ART), often results in considerable psychological distress due to the utilization of
10
11 97 inappropriate methods. Thus, better characterizing the origins of male infertility is of critical
12
13 98 importance.

14 99 This report focuses on the case of a young couple, Mr. and Mrs. S, who have unexplained
15
16 100 infertility after a female and male examination. After 18 months of infertility, this couple was first
17
18 101 treated with intrauterine insemination (6 unsuccessful cycles) and then with conventional IVF,
19
20 102 resulting in a complete failure of fertilization before having two children after IVF-ICSI. After the
21
22 103 treatment, our patient Mr. S contacted us again to report a similar infertility in his heterozygous
23
24 104 twin brother, infertility associated with hypoacusis. Mr. S's brother was diagnosed with a deletion
25
26 105 of chromosome 15, at position 15q13.3. This deletion involved the *STRC* gene, which causes
27
28 106 autosomal recessive deafness, and the *CATSPER 2* gene, which has been implicated in cases
29
30 107 of male infertility (2, 3). After conducting another interview with our patient Mr. S, we discovered
31
32 108 that he also had hearing loss that was never mentioned during the interviews.

33 109 Major sperm cell processes needed for fertilization such as chemotaxis, capacitation or
34
35 110 acrosome reaction are regulated by intracellular calcium signaling (4). These oscillations in $[Ca^{2+}]_i$
36
37 111 (i.e. free intracellular calcium concentration) can be mediated by release from intracellular stores
38
39 112 or via the opening of transmembrane calcium channels. CATSPER (cation channel for sperm) is
40
41 113 the only channel exclusively expressed in spermatozoa (5). This channel is pH-sensitive, weakly
42
43 114 voltage-dependent and primarily permeable to calcium but also to other ions such as sodium,
44
45 115 cesium and barium to a lesser extent (5, 6). CATSPER, a heterotetrameric pore-forming complex
46
47 116 comprising four α subunits (CATSPER 1 to 4) and six auxiliary subunits (CATSPER β , γ , δ , ϵ , ζ ,
48
49 117 and EFCAB9), is primarily situated in the principal piece of the flagellum in mature spermatozoa
50
51 118 (7, 8). Each subunit is encoded by a distinct gene. By virtue of its function, the CATSPER channel
52
53 119 regulates a large number of physiological processes of the spermatozoa requiring calcium,
54
55 120 including hyperactivation and chemotaxis to the oocyte (6, 9-11). The role of CATSPER in the
56
57 121 acrosome reaction is still debated, but it is thought to be responsible for the initial and transient
58
59 122 increase in Ca^{2+} that leads to a calcium elevation in the sperm head via a release of Ca^{2+}
60
61 123 dependent on the intracellular store (12). However, a study in murine spermatozoa suggested
62
63 124 that the increase in $[Ca^{2+}]_i$ mediated by CATSPER did not appear to be required for acrosome
64
65 125 reaction (13). Either way, since its discovery in 2001, CATSPER is known to be essential for
66
67 126 male fertility (14). Indeed, despite normal semen parameters, mice lacking CATSPER are infertile
68
69 127 (15). The scientific understanding of the importance of CATSPER in human spermatozoa

128 considers the clinical identification of abnormal cases. Several cases of genetic abnormalities of
1 129 *CATSPER* in infertile men have been reported. There are two types of *CATSPER*-related male
2
3 130 infertility: non-syndromic male infertility (*CATSPER 1* and *3* mutation) and syndromic male
4
5 131 infertility (*CATSPER 2* mutation) associated with deafness (2) (Table 1). Only few cases of
6
7 132 infertility linked to *CATSPER* mutations are described in the literature and as far as we know,
8
9 133 only one other case of *CATSPER 2* mutation linked to idiopathic infertility has been reported to
10 134 date (3) while the majority of *CATSPER* mutations are associated with abnormal conventional
11 135 sperm parameters (Table 1). Moreover, the originality of our case is to give a complete genetic,
12
13 136 molecular and clinical description of our patient with a *CATSPER2* mutation.
14
15 137 After the description of the clinical and biological background, the aim of our work was to
16 138 explain the pathophysiology of infertility in two brothers with unexplained infertility associated
17
18 139 with hypoacusis, assessing the functional impact of a homozygous deletion of *CATSPER 2* via
19
20 140 acrosome reaction and intracellular calcium response induced by two different stimuli:
21 141 progesterone and ionomycin.
22
23 142

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

143 **Material and Methods**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

144 *Patients*

145 GERMETHEQUE biobank (BB-0033-00081), site of Toulouse, provided samples of frozen
146 spermatozoa from patient 1 and their associated data to realize this project. GERMETHEQUE
147 obtained consent from each patient to use their samples (CPP 2.15.27). The GERMETHEQUE
148 pilotage committee approved the study design the 25/08/2022 referenced under the number
149 20220807. The Biobank has a declaration DC-2021-4820 and an authorization AC-2019-3487.
150 Conventional sperm parameters analysis and acrosome reaction assessment have been
151 performed on fresh sample from patient 1. Measurement of intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ have
152 been performed on frozen samples from the same patient stored in the biobank Gemetheque.

154 *Genetic diagnostics*

155 Quantitative MLPA analysis (kil P461 IVIRC-Holland) of the *STRC* gene.

157 *Conventional sperm parameters*

158 Fresh semen evaluation (spermiogram) was performed in accordance with the standard
159 methodology proposed by the WHO guidelines (16) and sperm morphology was evaluated using
160 modified David's classification after Schorr staining.

162 *Acrosome reaction assessment*

163 After liquefaction for 30 min at 37°C, semen was prepared on a density gradient. Sperm
164 preparation was then incubated for 3.5 hours for capacitation. Acrosome status was assessed
165 before and after acrosome induction with ionomycin A23187 (10 μ M) (Sigma-Aldrich, St-Quentin-
166 Fallavier) in accordance with WHO guidelines 2021 (16) or progesterone (1 mmol/L) (Sigma-
167 Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) with a minimum count of 200 cells per patient. To do so,
168 acrosomal content was labelled with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated peanut
169 agglutinin PNA-FITC (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) (25 μ g/mL), which is lost after
170 acrosome reaction (17). The inner acrosomal membrane was labelled before membrane
171 permeabilization with a mouse anti-CD46 monoclonal antibody linked to Alexa Fluor 647 (Santa
172 Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (10 μ g/ml), this labelling is acquired after acrosomal
173 reaction. Acrosome reaction is therefore associated with both a loss of PNA labelling and an
174 acquisition of CD46 labelling.

176 *Measurement of intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$.*

177 Frozen sperm samples from the patient of interest (Mr. S) or fertile control donors were used for
178 this study. Sperm samples were thawed and prepared as described in the previous paragraph

179 for capacitation. Just after thawing, total cell concentration and viability of each sample were
1 180 quantified by eosin staining.
2
3 181 During all calcium mobilization assays, measurements of calcium responses were carried out on
4
5 182 4 million spermatozoa per condition. For all the following incubation and washing steps, a ratio
6
7 183 of 100 μ L of liquid for 4 million cells was systematically applied. After capacitation, the appropriate
8
9 184 volume of semen was centrifuged during 5 min at 300 g. The supernatant was removed and the
10 185 remaining cell pellet was incubated 30 min à 37°C with a Ca²⁺-sensitive fluo-8 probe (Screen
11 186 Quest™ Fluo-8 calcium AAT bioquest®) prepared following the manufacturer
12
13 187 recommendations. Stained spermatozoa were then centrifuged 5 min at 300 g and washed one
14
15 188 time with HBSS (Gibco) after fluo-8 solution removal. After a final step of centrifugation (5 min -
16
17 189 300 g), spermatozoa were placed in HBSS containing or not Ca²⁺ ions and transferred in a dark
18
19 190 96-well plate (Greiner Bio-One, 655090) at the rate of 100 μ l per well. Calcium signals were
20 191 recorded upon addition of Progesterone (concentration) or ionomycin (concentration) using a
21
22 192 Novostar plate reader (BMG Labtech). Cell fluorescence (λ_{ex} = 485 nm; λ_{em} = 520 nm) was
23
24 193 recorded during 230 seconds with a baseline measurement for 30s before cell stimulation. The
25
26 194 calcium mobilization kinetics were expressed in normalized values by dividing each fluorescence
27
28 195 value for a given time by the baseline value (F/baseline). For some experiments, spermatozoa
29
30 196 were pre-incubated with Mibefradil dihydrochloride hydrate (M5441-5MG, Sigma-Aldrich, St-
31
32 197 Quentin-Fallavier), a T-type calcium channel antagonist, or its vehicle (0.5 % water diluted in
33
34 198 HBSS) 5 min before stimulation.

35 199

36 200 *Statistics*

37 201 Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad Software, La Jolla,
38 202 California). Percentages of spermatozoa with reacted acrosome were compared using the χ^2
39
40 203 test, the significance level was fixed at p<0.05.

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

204 **Results**

1 205 *Initial fertility check-up.*

3 206 Normal conventional sperm parameters were found for Patient S and his brother (Table 2).

4 207 Mrs. S, 30 years old had regular cycles and a normal hormonal balance. The exploration of the

6 208 fallopian tubes by hysterosalpingography revealed permeable fallopian tubes.

8 209

9 210 *ART outcomes*

10 211 Patient S and his partner initially received 6 intrauterine inseminations (IUI) with sperm from

11 212 partner. However, no pregnancy was achieved.

13 213 The couple was subsequently managed in conventional IVF: 12 mature retrieved ovocytes

14 214 leading to total fertilization failure at day 1.

15 215 They then underwent 3 IVF-ICSI attempts resulting in a pregnancy and the birth of a healthy child

16 216 in 2015 and 2 supplementary ICSI for a 2nd healthy baby in 2019. Using ICSI fertilization, the

17 217 rate was normal: 86% (6/7); 100% (2/2); and 100% (10/10) in 2015 and 66% (2/3) and 62.5%

18 218 (5/8) in 2019.

19 219 Patient S' brother and his partner received, in another IVF clinic, 5 IUI for idiopathic infertility as

20 220 his brother; no pregnancy was obtained after IUI. Then the couple received a conventional IVF

21 221 resulting in a total fertilization failure. They then underwent 2 ICSI giving normal fertilization rates

22 222 on 11 and 8 ovocytes but no pregnancy was obtained after 2 fresh embryo transfers and 2 frozen

23 223 embryo transfers. Couple stopped medical care for personal reasons (Table 2).

24 224

25 225 *Genetic testing*

26 226 As in his brother, molecular genetic test found a homozygote deletion of *STRC* gene in Patient

27 227 S (NM 153700: c.1-? 5328+?del) with autosomal recessive transmission. This deletion also

28 228 removes the *CATSPER 2* gene.

29 229

30 230 *Acrosome reaction assessment with PNA labelling and CD46 antibody*

31 231 In the absence of an inducer, the fertile control patient showed a spontaneous acrosome reaction

32 232 of 35% (194/549). This spontaneous acrosome reaction was decreased for Mr. S's sperm

33 233 compared to the control: 21% (107/511) ($p < 0.0001$). After induction with ionomycin, patient S

34 234 and the control had respectively 35% (298/858) and 59% (625/1057) of reacted spermatozoa

35 235 ($p < 0.0001$) (Figure 1). After progesterone stimulation, Mr. S had 22.2% (117/527) of reacted

36 236 spermatozoa compared to 69% (232/338) for the control ($p < 0.0001$). In summary, for Mr.S the

37 237 rate of spontaneous and progesterone-induced acrosome reaction was quite similar while it was

38 238 slightly increased by ionomycin. (Figure 1).

39 239

40 240 *Measurement of intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ flux.*

41 241

42 242

43 243

44 244

45 245

46 246

47 247

48 248

49 249

50 250

51 251

52 252

53 253

54 254

55 255

56 256

57 257

58 258

59 259

60 260

61 261

62 262

63 263

64 264

65 265

241 In order to investigate the functional consequence of CATSPER deficiency in patient S,
1 242 we monitored the intracellular calcium influx in response to different agonists. We first validated
2 243 the ability of a control sperm sample obtained from a fertile donor to generate calcium signals
3 244 (Fig. 2A). As expected, progesterone, an endogen CATSPER agonist, elicited a clear and
4 245 transient $[Ca]_i$ elevation that was almost completely abolished in the absence of extracellular
5 246 Ca^{2+} , confirming the involvement of a transmembrane calcium channel in this response. The
6 247 progesterone-induced response was also prevented by 40 μ M mibefradil, a T-type calcium
7 248 channel antagonist that has previously been described as a CATSPER signaling blocker (10). In
8 249 agreement with this previous study, while inhibiting the early calcium response induced by
9 250 progesterone, mibefradil alone induced a low and delayed calcium mobilization in spermatozoa
10 251 but with a totally different kinetic compared to progesterone.

11 252 We then compared the calcium response obtained with the semen of this control patient
12 253 and those of the infertile patient S. As shown in Fig. 2B, spermatozoa from the infertile patient S
13 254 were completely unable to respond to progesterone unlike those from the control donors.
14 255 Interestingly, semen from both patient S and fertile donors were responding to ionomycin
15 256 treatments (Fig.2C). However, we can evidence a slightly lower response after Ionomycin in
16 257 patient S compare to fertile control.

17 258 Together these results show that the genetic deletion of the *CATSPER 2* locus in patient
18 259 S is associated with hyposensitivity to acrosomal reaction inducers and a complete inability of
19 260 progesterone to activate intracellular calcium signaling in his spermatozoa.

20 261

21 262

22 263

23 264

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

265 **Discussion**

1
2 266 Scientific data, in particular from animals shows the importance of the CatSper channel
3
4 267 in essential sperm functions such as hyperactivation, capacitation and acrosome reaction (5, 7,
5
6 268 14, 18, 19). Few cases of patients with *CATSPER* mutation have been reported to date (20-26)
7
8 269 and differences and controversies exist in the pathophysiological role of *CATSPER* in the
9
10 270 acrosome reaction and/or the clinical impact of its deficiency. In this study we report a new familial
11
12 271 case of unexplained male infertility and IVF failure linked with hypoacusis in twin brothers. Our
13
14 272 word describes a deep characterization of this case, combining genetic, molecular (assessment
15
16 273 of acrosome reaction and [Ca²⁺]_i), and phenotypic (clinical examination, conventional sperm
17
18 274 parameters and results of ART attempts) approaches.

17 275 Previous clinical investigations identified a genetic deletion of the 15q15.3 locus in Mr.
18
19 276 S's twin brother that encompasses both the *STRC* gene (involved in hearing function) and
20
21 277 *CATSPER 2*. Interestingly, our genetic analysis also confirmed the presence of the genetic
22
23 278 deletion of *STRC* for patient S. The deletion of the 15q15.3 region is rarely reported in the
24
25 279 literature, but is often associated with male infertility, which is consistent with our results (24, 25,
26
27 280 27) (Table 1). In accordance with our observations on patient S, mice deficient for *CATSPER 2*
28
29 281 exhibit normal semen parameters but are infertile with a defect in sperm's hyperactivated motility
30
31 282 (28, 29). Deciphering the functional outcomes of *CATSPER* mutations in human clinical cases is
32
33 283 therefore of fundamental importance.

32 284 In our study, *CATSPER*-deficient spermatozoa did not show significant morphological
33
34 285 alterations. These results are consistent with murine studies that found no effect of genetic
35
36 286 deletion of different *CATSPER* subunits on sperm production and morphology (15, 30, 31).
37
38 287 However, because of significant morphological and functional differences between mouse and
39
40 288 male spermatozoa, these latter studies cannot be directly transposed to humans. In accordance
41
42 289 with our study, Luo *et al.* identified no abnormal semen parameters in a patient with comparable
43
44 290 *CATSPER 2* deletion (3).

44 291 The achievement of acrosome reaction is a key event for a normal natural fertilization.
45
46 292 Our experiments demonstrated that progesterone, as a *CATSPER* agonist, failed to induce
47
48 293 acrosome reaction in Mr. S's spermatozoa. Since *CATSPER 2* gene is deleted in Mr S patient,
49
50 294 our result is in agreement with studies reporting that *CATSPER* is required for a progesterone-
51
52 295 induced acrosome reaction (3, 32, 33). This inability to achieve progesterone-induced acrosome
53
54 296 reaction is likely to be one of the functional consequences of *CATSPER 2* deletion that explains
55
56 297 the infertility of patient S.

55 298 The calcium flux analysis carried out simultaneously corroborates the results on the
56
57 299 acrosome reaction. In our fertile control donor, we validated that progesterone induced a calcium
58
59 300 signaling that was fully dependent on *CATSPER*, being abolished both by depletion of
60
61
62
63
64
65

301 extracellular calcium and the Catsper antagonist Mibefradil as described by Strünker *et al.* (10).
1 302 Inability of progesterone, but not ionomycin, to increase $[Ca^{2+}]_i$ is indicative of a loss of CATSPER
2
3 303 function in our patient Mr. S. Similar results in sperm from a patient presenting a *CATSPER 2*
4
5 304 deletion were demonstrated by Luo and colleagues (3). In addition to acrosome reaction, calcium
6
7 305 signals drive various central behaviors of spermatozoa such as chemotaxis, capacitation and
8
9 306 hyperactivation (34). Hence, the inability of CATSPER-deficient sperm to induce progesterone-
10
11 307 dependent calcium influx and subsequent signaling gives a mechanistic explanation for the
12
13 308 infertility of patient S.

13 309 Interestingly, spermatozoa from patient S showed a positive but quite reduced ability to
14
15 310 undergo acrosome reaction in response to ionomycin compared to our fertile control donor. In
16
17 311 the same way, ionomycin-induced calcium signals were slightly reduced in patient S compared
18
19 312 to our fertile control. The primary mechanism described for ionomycin is the binding of
20
21 313 extracellular calcium to promote the passage of calcium into the intracellular compartment.
22
23 314 However, Dedkova *et al.* described that, depending of its concentration, ionomycin may also
24
25 315 promote calcium release from intracellular organelles into the intracellular compartment or
26
27 316 facilitate extracellular calcium entry through activation of unknown Ca^{2+} -channels (35). Therefore,
28
29 317 knowing that CATSPER is one of the major Ca^{2+} -channels on the surface of spermatozoa, this
30
31 318 last mechanism could explain a lower calcium flow and ionomycin-induced acrosome reaction in
32
33 319 spermatozoa from patient S.

31 320 Concerning ART outcomes, the failure of extracellular calcium mobilization and acrosome
32
33 321 reaction in our patient of interest provides a plausible explanation for the failures of conventional
34
35 322 IVF but the success of IVF-ICSI for this couple. At a clinical point of view, the usefulness of
36
37 323 calcium flow assay for the diagnostic of unexplained male fertility could be re-emphasize and the
38
39 324 IVF-ICSI technique is an efficient tool to obtain fertilization in these infertile men and should be
40
41 325 proposed as first option in the presence of these indications.

41 326 The originality of our case is to give a complete genetic, molecular and clinical description
42
43 327 of our patient with a *CATSPER2* mutation. While the majority of *CATSPER* mutations are
44
45 328 associated with abnormal conventional sperm parameters (8/11 on Table 1), greater vigilance is
46
47 329 required in male infertility qualified as "idiopathic" as in this case. Genetic analysis and
48
49 330 identification of the CATSPER channel abnormality in our patient S and his brother was carried
50
51 331 out retrospectively. As a result, these two patients and their spouses suffered from too long
52
53 332 medical care with repeated failures of intrauterine insemination. This case report underlines once
54
55 333 again the necessity to perform a complete female and male questioning during infertility
56
57 334 investigation. When infertility is coupled with deafness or hypoacusis, it is crucial to heighten our
58
59 335 vigilance, initiate genetic exploration and counseling, and promptly refer the couple to IVF-ICSI
60
61 336 treatment, even if the sperm parameters appear normal.

60
61
62
63
64
65

337 Furthermore, human model for the study of *CATSPER* mutations are necessary. The
1 338 *CATSPER* family has relatively low sequence homologies between different species (5). For
2
3 339 example, the homology of the different *CATSPER* subunits between mice and humans is
4
5 340 relatively low, ranging from 50% (*CATSPER* 1) to 69% (*CATSPER* 4). This could explain the
6
7 341 significant differences in *CATSPER* function and regulation between the different species (36).
8
9 342 In terms of the limitations of our study, it is important to note the absence of a complete
10 343 family tree of Mr. S and the impossibility to perform calcium flow and acrosome reaction tests on
11 344 the brother of our patient for geographical reasons. Moreover, it would have been interesting to
12
13 345 explore specifically sperm capacitation but we failed to do this because of lack of fresh samples.
14
15 346 In conclusion, this work led to a better understanding of certain cases of idiopathic male
16 347 infertility. It allowed us to show the link between the *CATSPER* 2 mutation, the functional deficit
17
18 348 of the calcium channels inducing a lack of acrosome reaction, infertility and numerous failure
19
20 349 ART attempts (IUI and IVFc) before turning to ICSI. The special feature of this study relates to
21
22 350 the small number of cases described in the literature. Only one other case of *CATSPER* 2
23 351 mutation linked to idiopathic infertility has been reported to date (3). Clinical testing does not
24
25 352 currently carry out a detection of *CATSPER* abnormalities. *CATSPER* abnormalities may
26
27 353 therefore represent an underdiagnosed cause of male infertility (3).
28 354
29
30 355
31
32 356
33
34 357
35 358
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

359 **Funding:**
1
2 360 The doctoral salary of S.G. was supported by Medical Research Foundation (FRM -
3
4 361 FDT202204014931) and National Research Institute for agriculture, feed and environment
5
6 362 (INRAE) to C.B.
7 363
8 364 **Disclosure statement:** The authors have no conflicts of interest to declare.
9
10 365
11
12 366 **Acknowledgements**
13 367 The authors thank the donor and patient for their willingness to provide information and sperm
14
15 368 samples. This study was supported by Germethèque Biobank (France – Site of Toulouse) which
16
17 369 provided samples (BB-0033-00081, CRB Germethèque, Toulouse, France (Germethèque
18
19 370 number 20220807). The authors thank the genetic laboratory of University Hospital of Poitiers,
20 371 France, for performing blood molecular genetic analysis.
21
22 372
23 373 **Authors' contributions:**
24
25 374 SG designed and performed the calcium flow analysis, analysed data, wrote and critically revised
26
27 375 the manuscript. CG collected data, performed acrosome reaction tests, and wrote the
28
29 376 manuscript. LT performed and analysed calcium flow analysis. FI and EH examined patient and
30 377 provided andrological clinical data. CB designed the study and critically revised the manuscript.
31
32 378 NG design the study, recruited patient, analysed data, and wrote the manuscript. All the authors
33
34 379 critically revised manuscript.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

380 **Figure Legend**

1
2 381 Figure 1. At left, % of spermatozoa with acrosome reacted (spontaneously or after inductor
3 382 Ionomycin or Progesterone). At right Peanut agglutinin (PNA) lectin (green labelling) and anti-
4 383 CD46 immunocytochemistry (red labelling) in patient S. Acrosome reacted spermatozoa (head
5 384 arrows) are CD46 positive and have PNA labelling of the equatorial plate. Spermatozoa with
6 385 intact acrosome (arrows) are CD46 negative and have PNA labelling of the whole acrosome.
7
8 386
9
10 387 Figure 2. Semen from patient S, carrying a *CATSPER 2* deletion, exhibited no calcium entry in
11 388 response to progesterone. (A) Calcium mobilization assay performed on Fluo-8-loaded fertile
12 389 control sperm. Injection of different agonists (arrow) was performed at time 30 seconds. The
13 390 fluorescence of the calcium Fluo-8 probe was recorded over 230 seconds and represents the
14 391 fluorescent level normalized by the baseline level ($F/\text{baseline}$), which is the level of
15 392 fluorescence before injection. (B-C) Intracellular calcium responses to 32 μM progesterone (B)
16 393 or 10 μM ionomycin (C) were compared between semen from fertile control donor (grey curves)
17 394 and the infertile patient S (black curves). The graphs represent the mean profile of two
18 395 independent experiments.
19
20
21 396
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

397 **References**

1
2 398 1. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. Oocyte activation deficiency: a role for an
3 399 oocyte contribution? *Hum Reprod Update* 2016;22:23-47.
4 400 2. Li H, Ding X, Guan H, Xiong C. Inhibition of human sperm function and mouse fertilization in
5 401 vitro by an antibody against cation channel of sperm 1: the contraceptive potential of its
6 402 transmembrane domains and pore region. *Fertil Steril* 2009;92:1141-6.
7 403 3. Luo T, Chen HY, Zou QX, Wang T, Cheng YM, Wang HF *et al*. A novel copy number variation in
9 404 CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod* 2019;34:414-
10 405 23.
11 406 4. Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA *et al*. Most fertilizing mouse
12 407 spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro
13 408 fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4892-6.
14 409 5. Sun XH, Zhu YY, Wang L, Liu HL, Ling Y, Li ZL *et al*. The Catsper channel and its roles in male
16 410 fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;15:65.
17 411 6. Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL. A voltage-gated ion channel expressed specifically in
18 412 spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12527-31.
19 413 7. Rahban R, Nef S. CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa.
21 414 *Mol Cell Endocrinol* 2020;518:110951.
22 415 8. Lin S, Ke M, Zhang Y, Yan Z, Wu J. Structure of a mammalian sperm cation channel complex.
23 416 *Nature* 2021;595:746-50.
24 417 9. Kirichok Y, Lishko PV. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol*
25 418 *Hum Reprod* 2011;17:478-99.
26 419 10. Strunker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R *et al*. The CatSper channel
28 420 mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* 2011;471:382-6.
29 421 11. Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GS, Garcia AA, Barratt CL *et al*. Ca²⁺ signalling
30 422 in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci* 2008;13:5623-37.
31 423 12. Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*
32 424 2015;30:28-38.
33 425 13. Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm
35 426 triggers a tail-to-head propagation. *Biol Reprod* 2007;77:551-9.
36 427 14. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q *et al*. A sperm ion channel required for
37 428 sperm motility and male fertility. *Nature* 2001;413:603-9.
38 429 15. Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L *et al*. All four CatSper ion
39 430 channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad*
41 431 *Sci U S A* 2007;104:1219-23.
42 432 16. . WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen WHO 2021.
43 433 17. Parinaud J, Labal B, Vieitez G, Richoille G, Grandjean H. Comparison between fluorescent
44 434 peanut agglutinin lectin and GB24 antibody techniques for the assessment of acrosomal status. *Hum*
45 435 *Reprod* 1993;8:1685-8.
46 436 18. Lishko PV, Mannowetz N. CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. *Curr Opin*
48 437 *Physiol* 2018;2:109-13.
49 438 19. Cooper JC, Phadnis N. Parallel Evolution of Sperm Hyper-Activation Ca²⁺ Channels. *Genome*
50 439 *Biol Evol* 2017;9:1938-49.
51 440 20. Avenarius MR, Hildebrand MS, Zhang Y, Meyer NC, Smith LL, Kahrizi K *et al*. Human male
52 441 infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet* 2009;84:505-10.
53 442 21. Hildebrand MS, Avenarius MR, Smith RJH. CATSPER-Related Male Infertility. In: Adam MP,
54 443 Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW *et al.*, eds. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA),
55 444 1993.
56 445 22. Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J *et al*. Genetic male
58 446 infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1178-84.
60
61
62
63
64
65

447 23. Avidan N, Tamary H, Dgany O, Cattan D, Pariente A, Thulliez M *et al.* CATSPER2, a human
1 448 autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet* 2003;11:497-502.
2 449 24. Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Lohr NJ *et al.* Sensorineural
3 450 deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome. *J Med Genet* 2007;44:233-40.
4 451 25. Jaiswal D, Singh V, Dwivedi US, Trivedi S, Singh K. Chromosome microarray analysis: a case
5 452 report of infertile brothers with CATSPER gene deletion. *Gene* 2014;542:263-5.
6 453 26. Wang J, Tang H, Zou Q, Zheng A, Li H, Yang S *et al.* Patient with CATSPER3 mutations-related
7 454 failure of sperm acrosome reaction with successful pregnancy outcome from intracytoplasmic sperm
8 455 injection (ICSI). *Mol Genet Genomic Med* 2021;9:e1579.
9 456 27. Nishio SY, Usami SI. Frequency of the STRC-CATSPER2 deletion in STRC-associated hearing loss
10 457 patients. *Sci Rep* 2022;12:634.
11 458 28. Carlson AE, Quill TA, Westenbroek RE, Schuh SM, Hille B, Babcock DF. Identical phenotypes of
12 459 CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J Biol Chem* 2005;280:32238-44.
13 460 29. Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. Hyperactivated sperm
14 461 motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14869-74.
15 462 30. Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM *et al.* Catsper3 and Catsper4 are essential for
16 463 sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2007;77:37-44.
17 464 31. Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. A novel gene required for male
18 465 fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2011;2:153.
19 466 32. Unates DR, Guidobaldi HA, Gatica LV, Cubilla MA, Teves ME, Moreno A *et al.* Versatile action of
20 467 picomolar gradients of progesterone on different sperm subpopulations. *PLoS One* 2014;9:e91181.
21 468 33. Publicover S, Barratt C. Reproductive biology: Progesterone's gateway into sperm. *Nature*
22 469 2011;471:313-4.
23 470 34. Correia J, Michelangeli F, Publicover S. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm.
24 471 *Reproduction* 2015;150:R65-76.
25 472 35. Dedkova EN, Sigova AA, Zinchenko VP. Mechanism of action of calcium ionophores on intact
26 473 cells: ionophore-resistant cells. *Membr Cell Biol* 2000;13:357-68.
27 474 36. Brown SG, Publicover SJ, Barratt CLR, Martins da Silva SJ. Human sperm ion channel
28 475 (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update* 2019;25:758-76.
29 476
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

	CATSPER 1 mutation		CATSPER 3 mutation
Reference	Avenarius et al. 2009		Wang et al,2020
Genetic abnormality	Exon 1 insertion (c.539-540insT)	Exon 1 insertion (c.948-949insATGGC)	Homozygous Variant (NM_178019.3 : exon5:c.707T>A,p.L236*)
Clinical description	Non syndromic infertility		Non syndromic infertility
Conventional sperm parameters	Semen volume : 1ml Sperm conc.: 12M/ml Progressive motility: 50 %	Semen volume : 0.4ml Sperm conc.: 10.4M/ml Progressive motility: 0 % Typical Forms : 20 %	Semen volume : 4,2 ml Sperm conc.: 17.1 M/ml Progressive motility: 54.6 % Typical Forms : 5 %
ART outcomes	Unknown	Unknown	5 Intrauterine insemination failures 1 cIVF : 6 oocytes, total fertilization failure 1 IVF-ICS: 6 meta II oocytes, 4 E at day 5. Ongoing pregnancy after 2 frozen embryo transfers.

	CATSPER 2 mutation								
Reference	Avidan et al.2003		Zhang et al.2007			Luo et al.2019	Jaiswal et al.2014		
Genetic abnormality	15q15.1-15.3 Deletion		15q15.1-15.3 Deletion			Variability of copy number: area 43894500-43950000 of chromosome 15	15q15.3 Deletion		
Clinical description	Syndromic infertility: asthenoteratozoospermia, deafness		Syndromic infertility: asthenoteratozoospermia, deafness			Idiopathic non syndromic infertility	Non syndromic infertility		
Conventional sperm parameters	NP	Volume :N Sperm conc. : N Motility : 3 % Typical Forms : 9 %	NP	Volume : 4ml Sperm conc. : 78M/ml Motility :5 % Typical Forms : 11 %	Volume : 2.2ml Sperm conc. : 73M/ml Motility : 10% Typical Forms : 7 %	Volume : 1ml Sperm conc. : 60M/ml Motility : 15% Typical Forms : 11 %	Volume : 2ml Sperm conc. : 75M/ml Motility: 75,7 % Vitality : 82,3 % Typical Forms : 12 %	Severe oligozoospermia <2M/ml	Oligozoospermia <5M/ml
ART outcomes	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	1 IVF cycle (18 oocytes) = cFIV (6 oocytes) : fertilization failure; ICSI (12 oocytes) : 7 embryos 1transferred embryo, 1 pregnancy	Unknown	Unknown

Table 1: Overview of clinical and biological literature data from infertile patients with CATSPER mutation.

N: Normal. NP: Not performed cIVF: conventional In Vitro Fertilization ART: Assisted Reproductive Technologies

	Patient S	Patient S' brother
Genetic abnormality	NM 153700: c.1-? 5328+?del	
Clinical description	Idiopathic infertility with hypoacusia	
Conventional sperm parameters	Semen volume: 5.6 ml Sperm concentration: 43 M/ml Progressive motility: 55% Typical Forms 27%	Semen volume: 3.5 ml Sperm concentration: 25 M/ml Progressive motility: 30% Typical Forms 29%
ART outcomes	6 Intrauterine insemination failures	5 Intrauterine insemination failures
	1 st cIVF: total fertilization failure on 12 meta II	1 st cIVF: total fertilization failure on 11 meta II
	1 st ICSI: 7 meta II oocytes, 6 E at day 2, 1 fresh embryo transfer and 2 frozen embryo transfers: no pregnancy	1 st ICSI : 10 meta II oocytes, 5 E, 1 fresh embryo transfer at day 3 : no pregnancy
	2 nd ICSI: 2 meta II oocytes, 2 E at day 2: 1 fresh embryo transfer: no pregnancy	2 nd ICSI: 6 meta II oocytes, 6 E with normal morphology: 1 fresh embryo transfer and 2 frozen embryo transfers at day 3: no pregnancy
	3 rd ICSI: 10 meta II oocytes, 10E at day 2: 1 fresh embryo transfer and 2 frozen embryo transfers: live birth of healthy baby girl	Stop medical care for personal reasons.
	1 st ICSI bis: 3 meta II oocytes, 2 E ay day 2, 1 fresh embryo transfer: no pregnancy	
	2 nd ICSI bis: 8 meta II oocytes, 5E at day 2, live birth of a healthy baby boy after fresh embryo transfer.	

Table 2: Clinical and biological data from our 2 brothers with idiopathic infertility, hypoacusis and CATSPER2 mutations. cIVF: conventional In Vitro Fertilization. ART: Assisted Reproductive Technologies. Meta II: metaphase II oocyte. E: embryos.

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Figure 1.jpg](#)

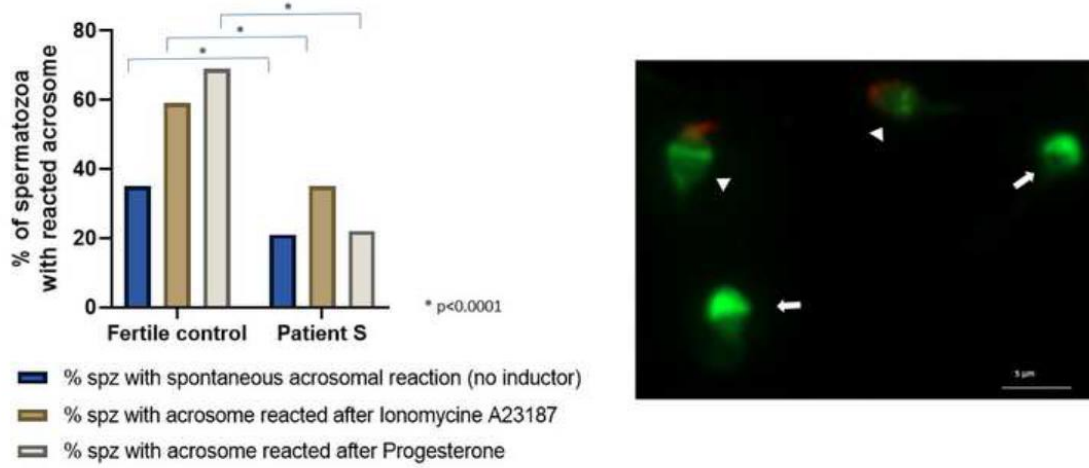
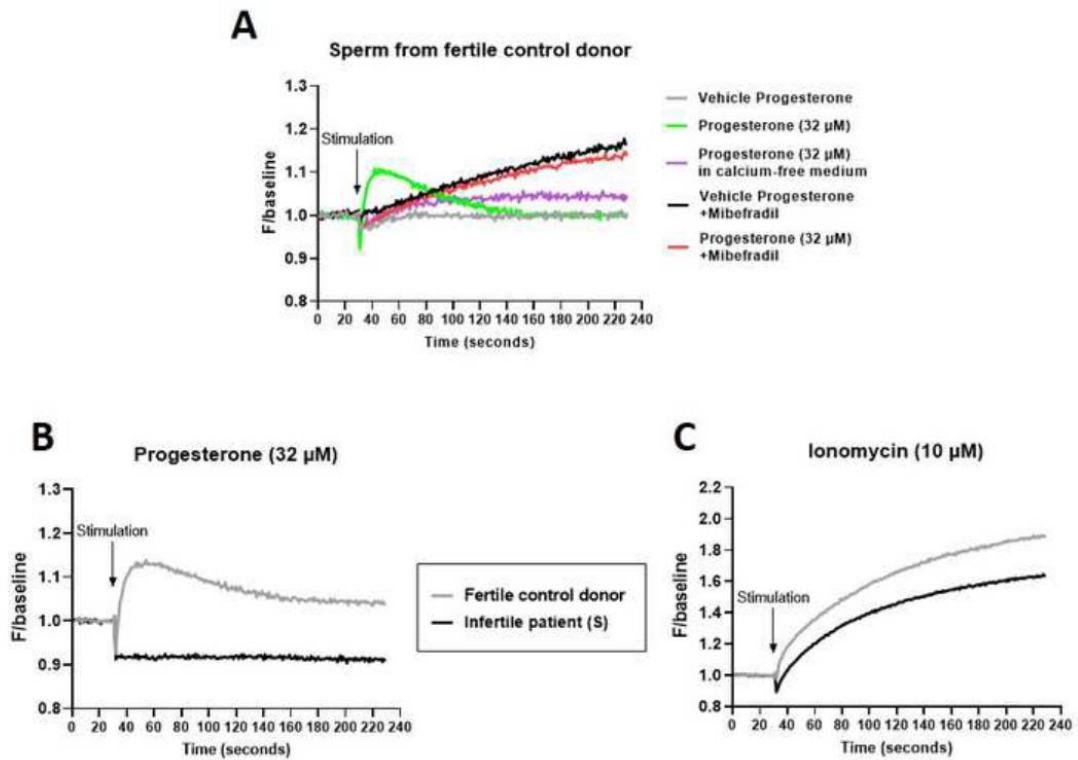


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Figure 2.jpg](#)



Références bibliographiques

- [1] G. Hounnou, C. Destrieux, J. Desmé, P. Bertrand, et S. Velut, « Anatomical study of the length of the human intestine », *Surg Radiol Anat*, vol. 24, n° 5, p. 290-294, déc. 2002, doi: 10.1007/s00276-002-0057-y.
- [2] J. Worsøe *et al.*, « Gastric transit and small intestinal transit time and motility assessed by a magnet tracking system », *BMC Gastroenterol*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, déc. 2011, doi: 10.1186/1471-230X-11-145.
- [3] P. P. Lopez, S. Gogna, et A. Khorasani-Zadeh, « Anatomy, Abdomen and Pelvis: Duodenum », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 9 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482390/>
- [4] N. Volk et B. Lacy, « Anatomy and Physiology of the Small Bowel », *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, vol. 27, n° 1, p. 1-13, janv. 2017, doi: 10.1016/j.giec.2016.08.001.
- [5] H. F. Helander et L. Fändriks, « Surface area of the digestive tract – revisited », *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 49, n° 6, p. 681-689, juin 2014, doi: 10.3109/00365521.2014.898326.
- [6] G. Rindi, A. B. Leiter, A. S. Kopin, C. Bordi, et E. Solcia, « The “normal” endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences », *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1014, p. 1-12, avr. 2004, doi: 10.1196/annals.1294.001.
- [7] M. E. V. Johansson, H. Sjövall, et G. C. Hansson, « The gastrointestinal mucus system in health and disease », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, n° 6, p. 352-361, juin 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.35.
- [8] J. C. Debongnie et S. F. Phillips, « Capacity of the human colon to absorb fluid », *Gastroenterology*, vol. 74, n° 4, p. 698-703, avr. 1978, doi: 10.1016/0016-5085(78)90246-9.
- [9] P. Gérard et A. Bernalier-Donadille, « Les fonctions majeures du microbiote intestinal », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol. 42, p. 28-36, avr. 2007, doi: 10.1016/S0007-9960(07)91318-8.
- [10] B. Z. Stanger et D. K. Podolsky, « Development of the Gastrointestinal System », in *Textbook of Gastroenterology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 567-602. doi: 10.1002/9781444303254.ch23.
- [11] M. Mathan, P. C. Moxey, et J. S. Trier, « Morphogenesis of fetal rat duodenal villi », *Am J Anat*, vol. 146, n° 1, p. 73-92, mai 1976, doi: 10.1002/aja.1001460104.
- [12] T. K. Noah, B. Donahue, et N. F. Shroyer, « Intestinal development and differentiation », *Exp Cell Res*, vol. 317, n° 19, p. 2702-2710, nov. 2011, doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.006.
- [13] A. Kostouros, I. Koliarakis, K. Natsis, D. A. Spandidos, A. Tsatsakis, et J. Tsiaoussis, « Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review) », *Int J Mol Med*, vol. 46, n° 1, p. 27-57, juill. 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4583.
- [14] P. de Santa Barbara, G. R. van den Brink, et D. J. Roberts, « Development and differentiation of the intestinal epithelium », *Cell Mol Life Sci*, vol. 60, n° 7, p. 1322-1332, juill. 2003, doi: 10.1007/s00018-003-2289-3.
- [15] N. Barker, « Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, n° 1, Art. n° 1, janv. 2014, doi: 10.1038/nrm3721.
- [16] Ö. Kayisoglu, N. Schlegel, et S. Bartfeld, « Gastrointestinal epithelial innate immunity-regionalization and organoids as new model », *J Mol Med (Berl)*, vol. 99, n° 4, p. 517-530, avr. 2021, doi: 10.1007/s00109-021-02043-9.

- [17] H. Cheng et C. P. Leblond, « Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types », *American Journal of Anatomy*, vol. 141, n° 4, p. 537-561, 1974, doi: 10.1002/aja.1001410407.
- [18] H. Cheng et C. P. Leblond, « Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types », *Am J Anat*, vol. 141, n° 4, p. 537-561, déc. 1974, doi: 10.1002/aja.1001410407.
- [19] M. Bjerknes et H. Cheng, « Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors », *Gastroenterology*, vol. 116, n° 1, p. 7-14, janv. 1999, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70222-2.
- [20] N. Barker *et al.*, « Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 », *Nature*, vol. 449, n° 7165, Art. n° 7165, oct. 2007, doi: 10.1038/nature06196.
- [21] K. S. Carmon, X. Gong, Q. Lin, A. Thomas, et Q. Liu, « R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° 28, p. 11452-11457, juill. 2011, doi: 10.1073/pnas.1106083108.
- [22] A. G. Schepers, R. Vries, M. van den Born, M. van de Wetering, et H. Clevers, « Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes », *The EMBO Journal*, vol. 30, n° 6, p. 1104-1109, mars 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.26.
- [23] F. Gerbe *et al.*, « Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium », *J Cell Biol*, vol. 192, n° 5, p. 767-780, mars 2011, doi: 10.1083/jcb.201010127.
- [24] N. Sasaki *et al.*, « Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, n° 37, p. E5399-5407, sept. 2016, doi: 10.1073/pnas.1607327113.
- [25] J. Beumer et H. Clevers, « Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 22, n° 1, Art. n° 1, janv. 2021, doi: 10.1038/s41580-020-0278-0.
- [26] J. H. van Es *et al.*, « A Critical Role for the Wnt Effector Tcf4 in Adult Intestinal Homeostatic Self-Renewal », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32, n° 10, p. 1918-1927, mai 2012, doi: 10.1128/MCB.06288-11.
- [27] D. Pinto, A. Gregorieff, H. Begthel, et H. Clevers, « Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium », *Genes Dev.*, vol. 17, n° 14, p. 1709-1713, juill. 2003, doi: 10.1101/gad.267103.
- [28] H. Tian *et al.*, « Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis », *Cell Rep*, vol. 11, n° 1, p. 33-42, avr. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.007.
- [29] Y. Lecarpentier, O. Schussler, J.-L. Hébert, et A. Vallée, « Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers », *Frontiers in Oncology*, vol. 9, 2019, Consulté le: 28 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01248>
- [30] T. Sato *et al.*, « Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts », *Nature*, vol. 469, n° 7330, Art. n° 7330, janv. 2011, doi: 10.1038/nature09637.
- [31] H. E. Abud, W. H. Chan, et T. Jardé, « Source and Impact of the EGF Family of Ligands on Intestinal Stem Cells », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, 2021,

- Consulté le: 28 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.685665>
- [32] O. Basak, J. Beumer, K. Wiebrands, H. Seno, A. van Oudenaarden, et H. Clevers, « Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 20, n° 2, p. 177-190.e4, févr. 2017, doi: 10.1016/j.stem.2016.11.001.
- [33] V. W. Y. Wong *et al.*, « Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling », *Nat Cell Biol*, vol. 14, n° 4, Art. n° 4, avr. 2012, doi: 10.1038/ncb2464.
- [34] H. J. Snippert *et al.*, « Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells », *Cell*, vol. 143, n° 1, p. 134-144, oct. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.09.016.
- [35] C. Lopez-Garcia, A. M. Klein, B. D. Simons, et D. J. Winton, « Intestinal Stem Cell Replacement Follows a Pattern of Neutral Drift », *Science*, vol. 330, n° 6005, p. 822-825, nov. 2010, doi: 10.1126/science.1196236.
- [36] L. Ritsma *et al.*, « Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging », *Nature*, vol. 507, n° 7492, Art. n° 7492, mars 2014, doi: 10.1038/nature12972.
- [37] O. Basak *et al.*, « Mapping early fate determination in Lgr5+ crypt stem cells using a novel Ki67-RFP allele », *The EMBO Journal*, vol. 33, n° 18, p. 2057-2068, sept. 2014, doi: 10.15252/embj.201488017.
- [38] H. Gehart et H. Clevers, « Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, n° 1, p. 19-34, janv. 2019, doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.
- [39] T. Ueo *et al.*, « The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation », *Development*, vol. 139, n° 6, p. 1071-1082, mars 2012, doi: 10.1242/dev.069070.
- [40] J. H. van Es *et al.*, « Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage », *Nat Cell Biol*, vol. 14, n° 10, p. 1099-1104, oct. 2012, doi: 10.1038/ncb2581.
- [41] O. Riccio *et al.*, « Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 », *EMBO reports*, vol. 9, n° 4, p. 377-383, avr. 2008, doi: 10.1038/embor.2008.7.
- [42] Z. Qi *et al.*, « BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, janv. 2017, doi: 10.1038/ncomms13824.
- [43] E. M. Fish et B. Burns, « Physiology, Small Bowel », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 3 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532263/>
- [44] A. C. Engevik et J. R. Goldenring, « Trafficking Ion Transporters to the Apical Membrane of Polarized Intestinal Enterocytes », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, n° 1, p. a027979, janv. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a027979.
- [45] H. Ohno, « Intestinal M cells », *J Biochem*, vol. 159, n° 2, p. 151-160, févr. 2016, doi: 10.1093/jb/mvv121.
- [46] K. Parikh *et al.*, « Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease », *Nature*, vol. 567, n° 7746, Art. n° 7746, mars 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0992-y.

- [47] G. A. Busslinger, B. L. A. Weusten, A. Bogte, H. Begthel, L. A. A. Brosens, et H. Clevers, « Human gastrointestinal epithelia of the esophagus, stomach, and duodenum resolved at single-cell resolution », *Cell Reports*, vol. 34, n° 10, p. 108819, mars 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108819.
- [48] J. Burclaff *et al.*, « A Proximal-to-Distal Survey of Healthy Adult Human Small Intestine and Colon Epithelium by Single-Cell Transcriptomics », *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 13, n° 5, p. 1554-1589, 2022, doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.02.007.
- [49] J. K. Gustafsson et M. E. V. Johansson, « The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 19, n° 12, Art. n° 12, déc. 2022, doi: 10.1038/s41575-022-00675-x.
- [50] H. Cheng, « Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine IV. Paneth cells », *American Journal of Anatomy*, vol. 141, n° 4, p. 521-535, 1974, doi: 10.1002/aja.1001410406.
- [51] H. Ireland, C. Houghton, L. Howard, et D. J. Winton, « Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine », *Dev Dyn*, vol. 233, n° 4, p. 1332-1336, août 2005, doi: 10.1002/dvdy.20446.
- [52] S. R. Lueschow et S. J. McElroy, « The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine », *Frontiers in Immunology*, vol. 11, 2020, Consulté le: 30 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00587>
- [53] G. G. Altmann, « Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon », *Am J Anat*, vol. 167, n° 1, p. 95-117, mai 1983, doi: 10.1002/aja.1001670109.
- [54] M. E. Rothenberg *et al.*, « Identification of a cKit+ Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5+ Stem Cells in Mice », *Gastroenterology*, vol. 142, n° 5, p. 1195-1205.e6, mai 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.006.
- [55] Y. Wang *et al.*, « Single-cell transcriptome analysis reveals differential nutrient absorption functions in human intestine », *J Exp Med*, vol. 217, n° 2, p. e20191130, févr. 2020, doi: 10.1084/jem.20191130.
- [56] H. Ahlman et null Nilsson, « The gut as the largest endocrine organ in the body », *Ann Oncol*, vol. 12 Suppl 2, p. S63-68, 2001, doi: 10.1093/annonc/12.suppl_2.s63.
- [57] L. J. Fothergill et J. B. Furness, « Diversity of enteroendocrine cells investigated at cellular and subcellular levels: the need for a new classification scheme », *Histochem Cell Biol*, vol. 150, n° 6, p. 693-702, déc. 2018, doi: 10.1007/s00418-018-1746-x.
- [58] F. Gerbe, C. Legraverend, et P. Jay, « The intestinal epithelium tuft cells: specification and function », *Cell Mol Life Sci*, vol. 69, n° 17, p. 2907-2917, 2012, doi: 10.1007/s00018-012-0984-7.
- [59] F. Gerbe *et al.*, « Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites », *Nature*, vol. 529, n° 7585, Art. n° 7585, janv. 2016, doi: 10.1038/nature16527.
- [60] J. von Moltke, M. Ji, H.-E. Liang, et R. M. Locksley, « Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit », *Nature*, vol. 529, n° 7585, p. 221-225, janv. 2016, doi: 10.1038/nature16161.
- [61] M. R. Howitt *et al.*, « Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut », *Science*, vol. 351, n° 6279, p. 1329-1333, mars 2016, doi: 10.1126/science.aaf1648.

- [62] M. Middelhoff *et al.*, « Prox1-positive cells monitor and sustain the murine intestinal epithelial cholinergic niche », *Nat Commun*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, janv. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-13850-7.
- [63] C. B. Westphalen *et al.*, « Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells », *J Clin Invest*, vol. 124, n° 3, p. 1283-1295, mars 2014, doi: 10.1172/JCI73434.
- [64] L. Li, M. Ma, T. Duan, et X. Sui, « The critical roles and therapeutic implications of tuft cells in cancer », *Front Pharmacol*, vol. 13, p. 1047188, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.1047188.
- [65] H. R. Withers et M. M. Elkind, « Microcolony Survival Assay for Cells of Mouse Intestinal Mucosa Exposed to Radiation », *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, vol. 17, n° 3, p. 261-267, janv. 1970, doi: 10.1080/09553007014550291.
- [66] C. Metcalfe, N. M. Kljavin, R. Ybarra, et F. J. de Sauvage, « Lgr5+ Stem Cells Are Indispensable for Radiation-Induced Intestinal Regeneration », *Cell Stem Cell*, vol. 14, n° 2, p. 149-159, févr. 2014, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.008.
- [67] C. Blanpain, M. Mohrin, P. A. Sotiropoulou, et E. Passegué, « DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 1, p. 16-29, janv. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2010.12.012.
- [68] S. Tao *et al.*, « Wnt activity and basal niche position sensitize intestinal stem and progenitor cells to DNA damage », *The EMBO Journal*, vol. 34, n° 5, p. 624-640, mars 2015, doi: 10.15252/embj.201490700.
- [69] Y. M. Nusse *et al.*, « Parasitic helminths induce fetal-like reversion in the intestinal stem cell niche », *Nature*, vol. 559, n° 7712, Art. n° 7712, juill. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0257-1.
- [70] M. Schmitt *et al.*, « Paneth Cells Respond to Inflammation and Contribute to Tissue Regeneration by Acquiring Stem-like Features through SCF/c-Kit Signaling », *Cell Rep*, vol. 24, n° 9, p. 2312-2328.e7, août 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.085.
- [71] B. J. Sheahan *et al.*, « Epithelial Regeneration After Doxorubicin Arises Primarily From Early Progeny of Active Intestinal Stem Cells », *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, n° 1, p. 119-140, 2021, doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.01.015.
- [72] H. Tian *et al.*, « A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable », *Nature*, vol. 478, n° 7368, p. 255-259, sept. 2011, doi: 10.1038/nature10408.
- [73] C. S. Potten, W. J. Hume, P. Reid, et J. Cairns, « The segregation of DNA in epithelial stem cells », *Cell*, vol. 15, n° 3, p. 899-906, nov. 1978, doi: 10.1016/0092-8674(78)90274-X.
- [74] R. K. Montgomery *et al.*, « Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° 1, p. 179-184, janv. 2011, doi: 10.1073/pnas.1013004108.
- [75] H. Clevers, « The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment », *Cell*, vol. 154, n° 2, p. 274-284, juill. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.
- [76] D. Grün *et al.*, « Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types », *Nature*, vol. 525, n° 7568, Art. n° 7568, sept. 2015, doi: 10.1038/nature14966.
- [77] J. Muñoz *et al.*, « The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent “+4” cell markers », *EMBO J*, vol. 31, n° 14, p. 3079-3091, juin 2012, doi: 10.1038/emboj.2012.166.

- [78] E. D. Bankaitis, A. Ha, C. J. Kuo, et S. T. Magness, « Reserve Stem Cells in Intestinal Homeostasis and Injury », *Gastroenterology*, vol. 155, n° 5, p. 1348-1361, nov. 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.016.
- [79] S. J. A. Buczacki *et al.*, « Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5 », *Nature*, vol. 495, n° 7439, Art. n° 7439, mars 2013, doi: 10.1038/nature11965.
- [80] P. W. Tetteh *et al.*, « Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters », *Cell Stem Cell*, vol. 18, n° 2, p. 203-213, févr. 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.01.001.
- [81] S. Yu *et al.*, « Paneth Cell Multipotency Induced by Notch Activation following Injury », *Cell Stem Cell*, vol. 23, n° 1, p. 46-59.e5, juill. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.002.
- [82] K. S. Yan *et al.*, « Intestinal enteroendocrine lineage cells possess homeostatic and injury-inducible stem cell activity », *Cell Stem Cell*, vol. 21, n° 1, p. 78-90.e6, juill. 2017, doi: 10.1016/j.stem.2017.06.014.
- [83] C. Harnack *et al.*, « R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon », *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, sept. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12349-5.
- [84] L. T. J. Kaaij *et al.*, « DNA methylation dynamics during intestinal stem cell differentiation reveals enhancers driving gene expression in the villus », *Genome Biol*, vol. 14, n° 5, p. R50, mai 2013, doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r50.
- [85] U. Jadhav *et al.*, « Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 21, n° 1, p. 65-77.e5, juill. 2017, doi: 10.1016/j.stem.2017.05.001.
- [86] I. M. Moya et G. Halder, « Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, n° 4, p. 211-226, avr. 2019, doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
- [87] Z. Cai, S. Wang, et J. Li, « Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review », *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, p. 765474, déc. 2021, doi: 10.3389/fmed.2021.765474.
- [88] A. Gregorieff, Y. Liu, M. R. Inanlou, Y. Khomchuk, et J. L. Wrana, « Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer », *Nature*, vol. 526, n° 7575, p. 715-718, oct. 2015, doi: 10.1038/nature15382.
- [89] E. R. Barry *et al.*, « Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP », *Nature*, vol. 493, n° 7430, p. 106-110, janv. 2013, doi: 10.1038/nature11693.
- [90] A. Ayyaz *et al.*, « Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell », *Nature*, vol. 569, n° 7754, Art. n° 7754, mai 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1154-y.
- [91] S. J. Keely, M. H. Montrose, et K. E. Barrett, « Electrolyte Secretion and Absorption: Small Intestine and Colon », in *Textbook of Gastroenterology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 330-367. doi: 10.1002/9781444303254.ch14.
- [92] V. Ganapathy, M. E. Ganapathy, et F. H. Leibach, « Protein Digestion and Assimilation », in *Textbook of Gastroenterology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 464-477. doi: 10.1002/9781444303254.ch19.
- [93] W. Sun, C.-M. Lo, et P. Tso, « Intestinal Lipid Absorption », in *Textbook of Gastroenterology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 445-463. doi: 10.1002/9781444303254.ch18.

- [94] V. Garcia-Hernandez, M. Quiros, et A. Nusrat, « Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation », *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1397, n° 1, p. 66-79, juin 2017, doi: 10.1111/nyas.13360.
- [95] M. A. Odenwald et J. R. Turner, « The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 14, n° 1, Art. n° 1, janv. 2017, doi: 10.1038/nrgastro.2016.169.
- [96] G. Barbara *et al.*, « Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier », *Frontiers in Nutrition*, vol. 8, 2021, Consulté le: 2 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.718356>
- [97] A. Horowitz, S. D. Chanez-Paredes, X. Haest, et J. R. Turner, « Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 20, n° 7, Art. n° 7, juill. 2023, doi: 10.1038/s41575-023-00766-3.
- [98] S. D. Chanez-Paredes, S. Abtahi, W.-T. Kuo, et J. R. Turner, « Differentiating between tight junction-dependent and tight junction-independent intestinal barrier loss in vivo », *Methods Mol Biol*, vol. 2367, p. 249-271, 2021, doi: 10.1007/7651_2021_389.
- [99] M. E. V. Johansson *et al.*, « Composition and functional role of the mucus layers in the intestine », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, n° 22, p. 3635-3641, nov. 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0822-3.
- [100] G. C. Hansson et M. E. Johansson, « The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria », *Gut Microbes*, vol. 1, n° 1, p. 51-54, 2010, doi: 10.4161/gmic.1.1.10470.
- [101] J. B. J. Kamphuis, M. Mercier-Bonin, H. Eutamène, et V. Theodorou, « Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view », *Sci Rep*, vol. 7, p. 8527, août 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08938-3.
- [102] L. W. Peterson et D. Artis, « Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis », *Nat Rev Immunol*, vol. 14, n° 3, Art. n° 3, mars 2014, doi: 10.1038/nri3608.
- [103] J. P. M. van Putten et K. Strijbis, « Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer », *J Innate Immun*, vol. 9, n° 3, p. 281-299, mai 2017, doi: 10.1159/000453594.
- [104] R. Okumura et K. Takeda, « Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis », *Exp Mol Med*, vol. 49, n° 5, Art. n° 5, mai 2017, doi: 10.1038/emm.2017.20.
- [105] P. Brandtzaeg, « Role of the Intestinal Immune System in Health », in *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach*, D. C. Baumgart, Éd., Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 23-56. doi: 10.1007/978-3-319-33703-6_2.
- [106] R. Latorre, C. Sternini, R. De Giorgio, et B. Greenwood-Van Meerveld, « Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role In Brain-Gut Communication », *Neurogastroenterol Motil*, vol. 28, n° 5, p. 620-630, mai 2016, doi: 10.1111/nmo.12754.
- [107] C. Andrews, M. H. McLean, et S. K. Durum, « Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function », *Front Immunol*, vol. 9, juin 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01270.
- [108] R. L. Wilson et C. E. Stevenson, « Chapter 56 - Anatomy and Physiology of the Stomach », in *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)*, C. J. Yeo, Éd., Philadelphia: Elsevier, 2019, p. 634-646. doi: 10.1016/B978-0-323-40232-3.00056-X.

- [109] P. M. Treuting, M. A. Valasek, et S. M. Dintzis, « 11 - Upper Gastrointestinal Tract », in *Comparative Anatomy and Histology*, P. M. Treuting et S. M. Dintzis, Éd., San Diego: Academic Press, 2012, p. 155-175. doi: 10.1016/B978-0-12-381361-9.00011-1.
- [110] C. P. Leblond, C. E. Stevens, et R. Bogoroch, « Histological Localization of Newly-formed Desoxyribonucleic Acid », *Science*, vol. 108, n° 2811, p. 531-533, nov. 1948, doi: 10.1126/science.108.2811.531.
- [111] T. Yoshioka *et al.*, « Bmi1 marks gastric stem cells located in the isthmus in mice », *J Pathol*, vol. 248, n° 2, p. 179-190, juin 2019, doi: 10.1002/path.5244.
- [112] S. Bartfeld et B.-K. Koo, « Adult gastric stem cells and their niches », *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, vol. 6, n° 2, mars 2017, doi: 10.1002/wdev.261.
- [113] S. Xiao et L. Zhou, « Gastric Stem Cells: Physiological and Pathological Perspectives », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, 2020, Consulté le: 21 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.571536>
- [114] D. E. Stange *et al.*, « Differentiated Trophoblast cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium », *Cell*, vol. 155, n° 2, p. 357-368, oct. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.008.
- [115] M. Leushacke *et al.*, « Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach », *Nat Cell Biol*, vol. 19, n° 7, p. 774-786, juill. 2017, doi: 10.1038/ncb3541.
- [116] M. Saqui-Salces *et al.*, « Gastric Tuft Cells Express DCLK1, and Increase in Hyperplasia », *Histochem Cell Biol*, vol. 136, n° 2, p. 191-204, août 2011, doi: 10.1007/s00418-011-0831-1.
- [117] J. M. Rodríguez *et al.*, « The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life », *Microb Ecol Health Dis*, vol. 26, p. 10.3402/mehd.v26.26050, févr. 2015, doi: 10.3402/mehd.v26.26050.
- [118] R. Sender, S. Fuchs, et R. Milo, « Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body », *PLoS Biol*, vol. 14, n° 8, p. e1002533, août 2016, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- [119] G. P. Donaldson, S. M. Lee, et S. K. Mazmanian, « Gut biogeography of the bacterial microbiota », *Nat Rev Microbiol*, vol. 14, n° 1, Art. n° 1, janv. 2016, doi: 10.1038/nrmicro3552.
- [120] J.-P. Motta, J. L. Wallace, A. G. Buret, C. Deraison, et N. Vergnolle, « Gastrointestinal biofilms in health and disease », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, n° 5, p. 314-334, mai 2021, doi: 10.1038/s41575-020-00397-y.
- [121] Y. Fan et O. Pedersen, « Gut microbiota in human metabolic health and disease », *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, n° 1, Art. n° 1, janv. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.
- [122] E. Thursby et N. Juge, « Introduction to the human gut microbiota », *Biochem J*, vol. 474, n° 11, p. 1823-1836, juin 2017, doi: 10.1042/BCJ20160510.
- [123] C. L. Hayes *et al.*, « Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis », *Sci Rep*, vol. 8, p. 14184, sept. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32366-6.
- [124] K. Smith, K. D. McCoy, et A. J. Macpherson, « Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota », *Semin Immunol*, vol. 19, n° 2, p. 59-69, avr. 2007, doi: 10.1016/j.smim.2006.10.002.
- [125] S. K. Mazmanian, C. H. Liu, A. O. Tzianabos, et D. L. Kasper, « An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System », *Cell*, vol. 122, n° 1, p. 107-118, juill. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007.

- [126] G. C. Actis, R. Pellicano, S. Fagoonee, et D. G. Ribaldone, « History of Inflammatory Bowel Diseases », *J Clin Med*, vol. 8, n° 11, p. 1970, nov. 2019, doi: 10.3390/jcm8111970.
- [127] C. McDowell, U. Farooq, et M. Haseeb, « Inflammatory Bowel Disease », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>
- [128] G. G. Kaplan et J. W. Windsor, « The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease », *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, n° 1, Art. n° 1, janv. 2021, doi: 10.1038/s41575-020-00360-x.
- [129] D. J. Mulder, A. J. Noble, C. J. Justinich, et J. M. Duffin, « A tale of two diseases: The history of inflammatory bowel disease », *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 8, n° 5, p. 341-348, mai 2014, doi: 10.1016/j.crohns.2013.09.009.
- [130] V. Chouraki *et al.*, « The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988–2007) », *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 33, n° 10, p. 1133-1142, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04628.x.
- [131] I. Ordás, L. Eckmann, M. Talamini, D. C. Baumgart, et W. J. Sandborn, « Ulcerative colitis », *The Lancet*, vol. 380, n° 9853, p. 1606-1619, nov. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
- [132] M. Fakhoury, R. Negrulj, A. Mooranian, et H. Al-Salami, « Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments », *J Inflamm Res*, vol. 7, p. 113-120, juin 2014, doi: 10.2147/JIR.S65979.
- [133] S. Viennot, « Diagnostic initial, suivi des MICI et détection des complications (Reco ECCO-ESGAR 2019) ».
- [134] D. C. Baumgart et W. J. Sandborn, « Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies », *The Lancet*, vol. 369, n° 9573, p. 1641-1657, mai 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60751-X.
- [135] W. F. Stenson, S. B. Hanauer, et R. D. Cohen, « Inflammatory Bowel Disease », in *Textbook of Gastroenterology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 1386-1472. doi: 10.1002/9781444303254.ch57.
- [136] J. Marsal et W. W. Agace, « Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease », *Journal of Internal Medicine*, vol. 272, n° 5, p. 411-429, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.02588.x.
- [137] B. B. Crohn, L. Ginzburg, et G. D. Oppenheimer, « Regional ileitis: A pathologic and clinical entity », *The American Journal of Medicine*, vol. 13, n° 5, p. 583-590, nov. 1952, doi: 10.1016/0002-9343(52)90025-9.
- [138] J. B. Kirsner, « Historical origins of current IBD concepts », *World J Gastroenterol*, vol. 7, n° 2, p. 175-184, avr. 2001, doi: 10.3748/wjg.v7.i2.175.
- [139] Ø. Hovde et B. A. Moum, « Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: Results from observational studies », *World J Gastroenterol*, vol. 18, n° 15, p. 1723-1731, avr. 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i15.1723.
- [140] I. R. Ranasinghe et R. Hsu, « Crohn Disease », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Consulté le: 5 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436021/>
- [141] H. J. Steinhardt, K. Loeschke, H. Kasper, K. H. Holtermüller, et H. Schäfer, « European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): clinical features and natural history », *Digestion*, vol. 31, n° 2-3, p. 97-108, 1985, doi: 10.1159/000199186.

- [142] K. M. de Lange *et al.*, « Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease », *Nat Genet*, vol. 49, n° 2, p. 256-261, févr. 2017, doi: 10.1038/ng.3760.
- [143] J. Hampe *et al.*, « Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations », *Lancet*, vol. 357, n° 9272, p. 1925-1928, juin 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(00)05063-7.
- [144] S. Yamamoto et X. Ma, « Role of Nod2 in the development of Crohn's disease », *Microbes and infection / Institut Pasteur*, vol. 11, n° 12, p. 912, oct. 2009, doi: 10.1016/j.micinf.2009.06.005.
- [145] M. Zhao et J. Burisch, « Impact of Genes and the Environment on the Pathogenesis and Disease Course of Inflammatory Bowel Disease », *Dig Dis Sci*, vol. 64, n° 7, p. 1759-1769, juill. 2019, doi: 10.1007/s10620-019-05648-w.
- [146] D. Piovani, S. Danese, L. Peyrin-Biroulet, G. K. Nikolopoulos, T. Lytras, et S. Bonovas, « Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses », *Gastroenterology*, vol. 157, n° 3, p. 647-659.e4, sept. 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.016.
- [147] J. Cosnes, « Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice », *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 18, n° 3, p. 481-496, juin 2004, doi: 10.1016/j.bpg.2003.12.003.
- [148] P. L. Lakatos *et al.*, « Is current smoking still an important environmental factor in inflammatory bowel diseases? Results from a population-based incident cohort », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 19, n° 5, p. 1010-1017, avr. 2013, doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802b3e.
- [149] Q. Guan, « A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease », *J Immunol Res*, vol. 2019, p. 7247238, déc. 2019, doi: 10.1155/2019/7247238.
- [150] A. Racine *et al.*, « Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 22, n° 2, p. 345-354, févr. 2016, doi: 10.1097/MIB.0000000000000638.
- [151] K. T. Dolan et E. B. Chang, « Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases », *Mol Nutr Food Res*, vol. 61, n° 1, p. 10.1002/mnfr.201600129, janv. 2017, doi: 10.1002/mnfr.201600129.
- [152] D. Gong, X. Gong, L. Wang, X. Yu, et Q. Dong, « Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease », *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2016, p. 6951091, 2016, doi: 10.1155/2016/6951091.
- [153] C. Manichanh *et al.*, « Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach », *Gut*, vol. 55, n° 2, p. 205-211, févr. 2006, doi: 10.1136/gut.2005.073817.
- [154] D. N. Frank, A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz, et N. R. Pace, « Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n° 34, p. 13780-13785, août 2007, doi: 10.1073/pnas.0706625104.
- [155] H. Sokol *et al.*, « Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, n° 43, p. 16731-16736, oct. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804812105.

- [156] R. Martín *et al.*, « The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 20, n° 3, p. 417-430, mars 2014, doi: 10.1097/01.MIB.0000440815.76627.64.
- [157] R. Martín *et al.*, « *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model », *BMC Microbiol*, vol. 15, p. 67, mars 2015, doi: 10.1186/s12866-015-0400-1.
- [158] U. Gophna, K. Sommerfeld, S. Gophna, W. F. Doolittle, et S. J. O. Veldhuyzen van Zanten, « Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis », *J Clin Microbiol*, vol. 44, n° 11, p. 4136-4141, nov. 2006, doi: 10.1128/JCM.01004-06.
- [159] C. Palmela *et al.*, « Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease », *Gut*, vol. 67, n° 3, p. 574-587, mars 2018, doi: 10.1136/gutjnl-2017-314903.
- [160] B. Kleessen, A. J. Kroesen, H. J. Buhr, et M. Blaut, « Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls », *Scand J Gastroenterol*, vol. 37, n° 9, p. 1034-1041, sept. 2002, doi: 10.1080/003655202320378220.
- [161] A. Swidsinski, J. Weber, V. Loening-Baucke, L. P. Hale, et H. Lochs, « Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease », *Journal of Clinical Microbiology*, juill. 2005, doi: 10.1128/jcm.43.7.3380-3389.2005.
- [162] J. T. Chang, « Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases », *N Engl J Med*, vol. 383, n° 27, p. 2652-2664, déc. 2020, doi: 10.1056/NEJMra2002697.
- [163] R. K. Sellon *et al.*, « Resident Enteric Bacteria Are Necessary for Development of Spontaneous Colitis and Immune System Activation in Interleukin-10-Deficient Mice », *Infect Immun*, vol. 66, n° 11, p. 5224-5231, nov. 1998.
- [164] G. J. Britton *et al.*, « Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t+ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice », *Immunity*, vol. 50, n° 1, p. 212-224.e4, janv. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.015.
- [165] K. J. Maloy et F. Powrie, « Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease », *Nature*, vol. 474, n° 7351, p. 298-306, juin 2011, doi: 10.1038/nature10208.
- [166] M. Shale, C. Schiering, et F. Powrie, « CD4+ T-cell subsets in intestinal inflammation », *Immunol Rev*, vol. 252, n° 1, p. 164-182, mars 2013, doi: 10.1111/imr.12039.
- [167] G. P. Ramos et K. A. Papadakis, « Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases », *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 94, n° 1, p. 155-165, janv. 2019, doi: 10.1016/j.mayocp.2018.09.013.
- [168] V. Strugala, P. W. Dettmar, et J. P. Pearson, « Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease », *Int J Clin Pract*, vol. 62, n° 5, p. 762-769, mai 2008, doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x.
- [169] D. Boltin, T. T. Perets, A. Vilkin, et Y. Niv, « Mucin function in inflammatory bowel disease: an update », *J Clin Gastroenterol*, vol. 47, n° 2, p. 106-111, févr. 2013, doi: 10.1097/MCG.0b013e3182688e73.
- [170] J. Wehkamp *et al.*, « Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 9, n° 4, p. 215-223, juill. 2003, doi: 10.1097/00054725-200307000-00001.
- [171] L. F. Courth, M. J. Ostaff, D. Mailänder-Sánchez, N. P. Malek, E. F. Stange, et J. Wehkamp, « Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins », *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 45, p. 14000-14005, nov. 2015, doi: 10.1073/pnas.1510084112.
- [172] D. Hollander, C. M. Vadheim, E. Brettholz, G. M. Petersen, T. Delahunty, et J. I. Rotter, « Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor », *Ann Intern Med*, vol. 105, n° 6, p. 883-885, déc. 1986, doi: 10.7326/0003-4819-105-6-883.
- [173] S. Zeissig *et al.*, « Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease », *Gut*, vol. 56, n° 1, p. 61-72, janv. 2007, doi: 10.1136/gut.2006.094375.
- [174] S. Čužić *et al.*, « Claudins: Beyond Tight Junctions in Human IBD and Murine Models », *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, 2021, Consulté le: 7 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.682614>
- [175] N. Vergnolle, « Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases », *Gut*, vol. 65, n° 7, p. 1215-1224, juill. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2015-309147.
- [176] J. Cosnes, C. Gower-Rousseau, P. Seksik, et A. Cortot, « Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases », *Gastroenterology*, vol. 140, n° 6, p. 1785-1794.e4, mai 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.055.
- [177] L. M. Franks et V. J. Hemmings, « A cell line from an induced carcinoma of mouse rectum », *J Pathol*, vol. 124, n° 1, p. 35-38, janv. 1978, doi: 10.1002/path.1711240108.
- [178] I. Nasri *et al.*, « PAR2-dependent activation of GSK3 β regulates the survival of colon stem/progenitor cells », *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 311, n° 2, p. G221-G236, août 2016, doi: 10.1152/ajpgi.00328.2015.
- [179] Z. Zhao *et al.*, « Organoids », *Nat Rev Methods Primers*, vol. 2, n° 1, Art. n° 1, déc. 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00174-y.
- [180] T. Sato *et al.*, « Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche », *Nature*, vol. 459, n° 7244, Art. n° 7244, mai 2009, doi: 10.1038/nature07935.
- [181] T. Sato *et al.*, « Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium », *Gastroenterology*, vol. 141, n° 5, p. 1762-1772, nov. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- [182] R. H. Powell et M. S. Behnke, « WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals », *Biol Open*, vol. 6, n° 5, p. 698-705, mai 2017, doi: 10.1242/bio.021717.
- [183] Y. Meng *et al.*, « Nicotinamide Promotes Cell Survival and Differentiation as Kinase Inhibitor in Human Pluripotent Stem Cells », *Stem Cell Reports*, vol. 11, n° 6, p. 1347-1356, déc. 2018, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.023.
- [184] M. Fujii, H. Clevers, et T. Sato, « Modeling Human Digestive Diseases With CRISPR-Cas9-Modified Organoids », *Gastroenterology*, vol. 156, n° 3, p. 562-576, févr. 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.048.
- [185] T. Sato et H. Clevers, « Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications », *Science*, vol. 340, n° 6137, p. 1190-1194, juin 2013, doi: 10.1126/science.1234852.
- [186] E. d'Aldebert *et al.*, « Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients », *Front Cell Dev Biol*, vol. 8, p. 363, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00363.
- [187] N. D. Rawlings et A. J. Barrett, « MEROPS: the peptidase database », *Nucleic Acids Res*, vol. 27, n° 1, p. 325-331, janv. 1999, doi: 10.1093/nar/27.1.325.

- [188] I. Schechter et A. Berger, « On the size of the active site in proteases. I. Papain », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 27, n° 2, p. 157-162, avr. 1967, doi: 10.1016/s0006-291x(67)80055-x.
- [189] B. Turk, « Targeting proteases: successes, failures and future prospects », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, n° 9, Art. n° 9, sept. 2006, doi: 10.1038/nrd2092.
- [190] C. K. Mathews, K. van Holde, et D. Appling, *Biochemistry*. Pearson, 2013.
- [191] E. Di Cera, « Serine Proteases », *IUBMB Life*, vol. 61, n° 5, p. 510-515, mai 2009, doi: 10.1002/iub.186.
- [192] S. Verma, R. Dixit, et K. C. Pandey, « Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets », *Frontiers in Pharmacology*, vol. 7, 2016, Consulté le: 21 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00107>
- [193] M. O. Hengartner, « The biochemistry of apoptosis », *Nature*, vol. 407, n° 6805, p. 770-776, oct. 2000, doi: 10.1038/35037710.
- [194] C. López-Otín et J. S. Bond, « Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 45, p. 30433-30437, nov. 2008, doi: 10.1074/jbc.R800035200.
- [195] R. E. Vandenbroucke et C. Libert, « Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 13, n° 12, Art. n° 12, déc. 2014, doi: 10.1038/nrd4390.
- [196] C. Chantrain et Y. A. DeClerck, « Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale », *Med Sci (Paris)*, vol. 18, n° 5, Art. n° 5, mai 2002, doi: 10.1051/medsci/2002185565.
- [197] N. D. Rawlings, « Peptidase inhibitors in the MEROPS database », *Biochimie*, vol. 92, n° 11, p. 1463-1483, nov. 2010, doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.013.
- [198] H. Mkaouer *et al.*, « Gut Serpinome: Emerging Evidence in IBD », *Int J Mol Sci*, vol. 22, n° 11, p. 6088, juin 2021, doi: 10.3390/ijms22116088.
- [199] J. A. Huntington et R. W. Carrell, « The serpins: nature's molecular mousetraps », *Sci Prog*, vol. 84, n° Pt 2, p. 125-136, 2001, doi: 10.3184/003685001783239032.
- [200] J. A. Irving, R. N. Pike, A. M. Lesk, et J. C. Whisstock, « Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function », *Genome Res*, vol. 10, n° 12, p. 1845-1864, déc. 2000, doi: 10.1101/gr-gr-1478r.
- [201] E. Perlino, R. Cortese, et G. Ciliberto, « The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes », *EMBO J*, vol. 6, n° 9, p. 2767-2771, sept. 1987, doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02571.x.
- [202] J. DIMBERG, K. STRÖM, S. LÖFGREN, N. ZAR, A. HUGANDER, et A. MATUSSEK, « Expression of the serine protease inhibitor serpinA3 in human colorectal adenocarcinomas », *Oncol Lett*, vol. 2, n° 3, p. 413-418, mai 2011, doi: 10.3892/ol.2011.280.
- [203] N. Matamala *et al.*, « Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency », *Journal of Translational Medicine*, vol. 13, n° 1, p. 211, juill. 2015, doi: 10.1186/s12967-015-0585-y.
- [204] N. Akermi *et al.*, « para-Sulphonato-calix[n]arene capped silver nanoparticles challenge the catalytic efficiency and the stability of a novel human gut serine protease inhibitor », *Chem Commun (Camb)*, vol. 55, n° 61, p. 8935-8938, août 2019, doi: 10.1039/c9cc03183a.

- [205] R. H. Law *et al.*, « An overview of the serpin superfamily », *Genome Biol*, vol. 7, n° 5, p. 216, 2006, doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
- [206] J.-M. Sallenave, « Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Elafin/Trappin-2 », *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 42, n° 6, p. 635-643, juin 2010, doi: 10.1165/rcmb.2010-0095RT.
- [207] C. Deraison, C. Bonnart, P. Langella, K. Roget, et N. Vergnolle, « Elafin and its precursor trappin-2: What is their therapeutic potential for intestinal diseases? », *British Journal of Pharmacology*, vol. 180, n° 2, p. 144-160, 2023, doi: 10.1111/bph.15985.
- [208] J.-P. Motta *et al.*, « Epithelial production of elastase is increased in inflammatory bowel disease and causes mucosal inflammation », *Mucosal Immunol*, mars 2021, doi: 10.1038/s41385-021-00375-w.
- [209] J.-P. Motta *et al.*, « Food-Grade Bacteria Expressing Elafin Protect Against Inflammation and Restore Colon Homeostasis », *Science Translational Medicine*, vol. 4, n° 158, p. 158ra144-158ra144, oct. 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3004212.
- [210] S. E. Williams, T. I. Brown, A. Roghanian, et J.-M. Sallenave, « SLPI and elafin: one glove, many fingers », *Clin Sci (Lond)*, vol. 110, n° 1, p. 21-35, janv. 2006, doi: 10.1042/CS20050115.
- [211] V. Rimphanitchayakit et A. Tassanakajon, « Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors », *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 34, n° 4, p. 377-386, avr. 2010, doi: 10.1016/j.dci.2009.12.004.
- [212] L. A. Kazal, D. S. Spicer, et R. A. Brahinsky, « Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas », *J Am Chem Soc*, vol. 70, n° 9, p. 3034-3040, sept. 1948, doi: 10.1021/ja01189a060.
- [213] T. Marchbank *et al.*, « Human pancreatic secretory trypsin inhibitor stabilizes intestinal mucosa against noxious agents », *Am J Pathol*, vol. 171, n° 5, p. 1462-1473, nov. 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.070192.
- [214] M. M. Burger, « Proteolytic Enzymes Initiating Cell Division and Escape from Contact Inhibition of Growth », *Nature*, vol. 227, n° 5254, Art. n° 5254, juill. 1970, doi: 10.1038/227170a0.
- [215] M. D. Hollenberg, K. K. Hansen, K. Mihara, et R. Ramachandran, « Proteolytic Enzymes and Cell Signaling: Pharmacological Lessons », in *Proteases and Their Receptors in Inflammation*, N. Vergnolle et M. Chignard, Éd., in Progress in Inflammation Research. , Basel: Springer Basel, 2011, p. 1-25. doi: 10.1007/978-3-0348-0157-7_1.
- [216] J. F. DESFORGES et F. S. BIGELOW, « An Action of Thrombin on Platelets in Accelerating Clotting », *Blood*, vol. 9, n° 2, p. 153-162, févr. 1954, doi: 10.1182/blood.V9.2.153.153.
- [217] E. F. Lüscher, « Viscous Metamorphosis of Blood Platelets and Clot Retraction* », *Vox Sanguinis*, vol. 1, n° 2, p. 133-153, 1956, doi: 10.1111/j.1423-0410.1956.tb03696.x.
- [218] K. C. Glenn et D. D. Cunningham, « Thrombin-stimulated cell division involves proteolysis of its cell surface receptor », *Nature*, vol. 278, n° 5706, Art. n° 5706, avr. 1979, doi: 10.1038/278711a0.
- [219] I. Magnaldo, J. Pouysségur, et S. Paris, « Thrombin exerts a dual effect on stimulated adenylate cyclase in hamster fibroblasts, an inhibition via a GTP-binding protein and a potentiation via activation of protein kinase C. », *Biochem J*, vol. 253, n° 3, p. 711-719, août 1988.
- [220] U. B. Rasmussen *et al.*, « cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization », *FEBS Lett*, vol. 288, n° 1-2, p. 123-128, août 1991, doi: 10.1016/0014-5793(91)81017-3.

- [221] T.-K. H. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, et S. R. Coughlin, « Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation », *Cell*, vol. 64, n° 6, p. 1057-1068, mars 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90261-V.
- [222] S. Nystedt, K. Emilsson, C. Wahlestedt, et J. Sundelin, « Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, n° 20, p. 9208-9212, sept. 1994.
- [223] A. J. Connolly, H. Ishihara, M. L. Kahn, R. V. Farese, et S. R. Coughlin, « Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor », *Nature*, vol. 381, n° 6582, Art. n° 6582, juin 1996, doi: 10.1038/381516a0.
- [224] H. Ishihara *et al.*, « Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans », *Nature*, vol. 386, n° 6624, p. 502-506, avr. 1997, doi: 10.1038/386502a0.
- [225] W. F. Xu *et al.*, « Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4 », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, n° 12, p. 6642-6646, juin 1998, doi: 10.1073/pnas.95.12.6642.
- [226] X. Han, M. T. Nieman, et B. A. Kerlin, « Protease-activated receptors: An illustrated review », *Res Pract Thromb Haemost*, vol. 5, n° 1, p. 17-26, déc. 2020, doi: 10.1002/rth2.12454.
- [227] M. L. Kahn, S. R. Hammes, C. Botka, et S. R. Coughlin, « Gene and Locus Structure and Chromosomal Localization of the Protease-activated Receptor Gene Family * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n° 36, p. 23290-23296, sept. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.36.23290.
- [228] T. K. Vu, V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, et S. R. Coughlin, « Domains specifying thrombin-receptor interaction », *Nature*, vol. 353, n° 6345, p. 674-677, oct. 1991, doi: 10.1038/353674a0.
- [229] M. T. Duvernay *et al.*, « Contributions of Protease-Activated Receptors PAR1 and PAR4 to Thrombin-Induced GPIIb/IIIa Activation in Human Platelets », *Mol Pharmacol*, vol. 91, n° 1, p. 39-47, janv. 2017, doi: 10.1124/mol.116.106666.
- [230] M. N. Adams *et al.*, « Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors », *Pharmacol Ther*, vol. 130, n° 3, p. 248-282, juin 2011, doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.003.
- [231] J. Chen, M. Ishii, L. Wang, K. Ishii, et S. R. Coughlin, « Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n° 23, p. 16041-16045, juin 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)33970-4.
- [232] A. Chandrabalan et R. Ramachandran, « Molecular mechanisms regulating Proteinase-Activated Receptors (PARs) », *FEBS J*, vol. 288, n° 8, p. 2697-2726, avr. 2021, doi: 10.1111/febs.15829.
- [233] K. Mihara, R. Ramachandran, B. Renaux, M. Saifeddine, et M. D. Hollenberg, « Neutrophil Elastase and Proteinase-3 Trigger G Protein-biased Signaling through Proteinase-activated Receptor-1 (PAR1) », *J Biol Chem*, vol. 288, n° 46, p. 32979-32990, nov. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.483123.
- [234] R. Ramachandran *et al.*, « Neutrophil Elastase Acts as a Biased Agonist for Proteinase-activated Receptor-2 (PAR2) », *J Biol Chem*, vol. 286, n° 28, p. 24638-24648, juill. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.201988.
- [235] A. Kuliopulos, L. Covic, S. K. Seeley, P. J. Sheridan, J. Helin, et C. E. Costello, « Plasmin Desensitization of the PAR1 Thrombin Receptor: Kinetics, Sites of Truncation, and

- Implications for Thrombolytic Therapy », *Biochemistry*, vol. 38, n° 14, p. 4572-4585, avr. 1999, doi: 10.1021/bi9824792.
- [236] C. J. Peach, L. E. Edgington-Mitchell, N. W. Bunnett, et B. L. Schmidt, « Protease-activated receptors in health and disease », *Physiological Reviews*, vol. 103, n° 1, p. 717-785, janv. 2023, doi: 10.1152/physrev.00044.2021.
- [237] M. D. Hollenberg, M. Saifeddine, B. al-Ani, et A. Kawabata, « Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides », *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 75, n° 7, p. 832-841, juill. 1997.
- [238] A. Kawabata *et al.*, « Potent and metabolically stable agonists for protease-activated receptor-2: evaluation of activity in multiple assay systems in vitro and in vivo », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 309, n° 3, p. 1098-1107, juin 2004, doi: 10.1124/jpet.103.061010.
- [239] J. J. McGuire, M. Saifeddine, C. R. Triggle, K. Sun, et M. D. Hollenberg, « 2-Furoyl-LIGRLO-amide: A Potent and Selective Proteinase-Activated Receptor 2 Agonist », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 309, n° 3, p. 1124-1131, juin 2004, doi: 10.1124/jpet.103.064584.
- [240] T. R. Faruqi, E. J. Weiss, M. J. Shapiro, W. Huang, et S. R. Coughlin, « Structure-Function Analysis of Protease-activated Receptor 4 Tethered Ligand Peptides: DETERMINANTS OF SPECIFICITY AND UTILITY IN ASSAYS OF RECEPTOR FUNCTION* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 26, p. 19728-19734, juin 2000, doi: 10.1074/jbc.M909960199.
- [241] J. Mwirigi *et al.*, « A role for protease activated receptor type 3 (PAR3) in nociception demonstrated through development of a novel peptide agonist », *J Pain*, vol. 22, n° 6, p. 692-706, juin 2021, doi: 10.1016/j.jpain.2020.12.006.
- [242] V. Trivedi *et al.*, « Platelet Matrix Metalloprotease-1 Mediates Thrombogenesis By Activating PAR1 at a Cryptic Ligand Site », *Cell*, vol. 137, n° 2, p. 332-343, avr. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.018.
- [243] W. I. Weis et B. K. Kobilka, « The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation », *Annu Rev Biochem*, vol. 87, p. 897-919, juin 2018, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033910.
- [244] S. R. Neves, P. T. Ram, et R. Iyengar, « G Protein Pathways », *Science*, vol. 296, n° 5573, p. 1636-1639, mai 2002, doi: 10.1126/science.1071550.
- [245] V. Syrovatkina, K. O. Alegre, R. Dey, et X.-Y. Huang, « Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins », *Journal of Molecular Biology*, vol. 428, n° 19, p. 3850-3868, sept. 2016, doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002.
- [246] R. Jain, U. Watson, L. Vasudevan, et D. K. Saini, « Chapter Three - ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs », in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 338, A. K. Shukla, Éd., in G Protein-Coupled Receptors: Emerging Paradigms in Activation, Signaling and Regulation Part A, vol. 338. , Academic Press, 2018, p. 79-109. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.02.003.
- [247] K. L. McCoy, S. F. Traynelis, et J. R. Hepler, « PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology », *Mol Pharmacol*, vol. 77, n° 6, p. 1005-1015, juin 2010, doi: 10.1124/mol.109.062018.
- [248] C. Avet *et al.*, « The PAR2 inhibitor I-287 selectively targets Gαq and Gα12/13 signaling and has anti-inflammatory effects », *Commun Biol*, vol. 3, n° 1, Art. n° 1, nov. 2020, doi: 10.1038/s42003-020-01453-8.

- [249] W. Sriwai, S. Mahavadi, O. Al-Shboul, J. R. Grider, et K. S. Murthy, « Distinctive G Protein-Dependent Signaling by Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) in Smooth Muscle: Feedback Inhibition of RhoA by cAMP-Independent PKA », *PLoS One*, vol. 8, n° 6, juin 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066743.
- [250] M. A. Ayoub et J.-P. Pin, « Interaction of Protease-Activated Receptor 2 with G Proteins and β -Arrestin 1 Studied by Bioluminescence Resonance Energy Transfer », *Frontiers in Endocrinology*, vol. 4, 2013, Consulté le: 23 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2013.00196>
- [251] S. Kim, J. Jin, et S. P. Kunapuli, « Relative contribution of G-protein-coupled pathways to protease-activated receptor-mediated Akt phosphorylation in platelets », *Blood*, vol. 107, n° 3, p. 947-954, févr. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-07-3040.
- [252] L. Seminario-Vidal *et al.*, « Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways », *J Biol Chem*, vol. 284, n° 31, p. 20638-20648, juill. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.004762.
- [253] M. G. H. Scott, A. Benmerah, et S. Marullo, « Endocytose des récepteurs couplés aux protéines G », *Med Sci (Paris)*, vol. 20, n° 1, Art. n° 1, janv. 2004, doi: 10.1051/medsci/200420178.
- [254] R. Ramachandran, F. Noorbakhsh, K. Defea, et M. D. Hollenberg, « Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 11, n° 1, p. 69-86, janv. 2012, doi: 10.1038/nrd3615.
- [255] L. Hein, K. Ishii, S. R. Coughlin, et B. K. Kobilka, « Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor », *J Biol Chem*, vol. 269, n° 44, p. 27719-27726, nov. 1994.
- [256] M. M. Paing, A. B. Stutts, T. A. Kohout, R. J. Lefkowitz, et J. Trejo, « beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation », *J Biol Chem*, vol. 277, n° 2, p. 1292-1300, janv. 2002, doi: 10.1074/jbc.M109160200.
- [257] B. L. Wolfe, A. Marchese, et J. Trejo, « Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1 », *The Journal of Cell Biology*, vol. 177, n° 5, p. 905, juin 2007, doi: 10.1083/jcb.200610154.
- [258] C.-H. Chen, M. M. Paing, et J. Trejo, « Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation », *J Biol Chem*, vol. 279, n° 11, p. 10020-10031, mars 2004, doi: 10.1074/jbc.M310590200.
- [259] O. Déry, C. U. Corvera, M. Steinhoff, et N. W. Bunnett, « Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 274, n° 6, p. C1429-C1452, juin 1998, doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.6.C1429.
- [260] T. K. Ricks et J. Trejo, « Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization », *J Biol Chem*, vol. 284, n° 49, p. 34444-34457, déc. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.048942.
- [261] T. H. Smith, L. J. Coronel, J. G. Li, M. R. Dores, M. T. Nieman, et J. Trejo, « Protease-activated Receptor-4 Signaling and Trafficking Is Regulated by the Clathrin Adaptor Protein Complex-2 Independent of β -Arrestins », *J Biol Chem*, vol. 291, n° 35, p. 18453-18464, août 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.729285.
- [262] P. Arora, T. K. Ricks, et J. Trejo, « Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer », *Journal of Cell Science*, vol. 120, n° 6, p. 921-928, mars 2007, doi: 10.1242/jcs.03409.

- [263] L. Stalheim *et al.*, « Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking », *Mol Pharmacol*, vol. 67, n° 1, p. 78-87, janv. 2005, doi: 10.1124/mol.104.006072.
- [264] C. Jacob *et al.*, « Mast Cell Trypsin Controls Paracellular Permeability of the Intestine ROLE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 2 AND β -ARRESTINS », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 36, p. 31936-31948, sept. 2005, doi: 10.1074/jbc.M506338200.
- [265] R. Latorre *et al.*, « Mice expressing fluorescent PAR2 reveal that endocytosis mediates colonic inflammation and pain », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 119, n° 6, p. e2112059119, févr. 2022, doi: 10.1073/pnas.2112059119.
- [266] R. Ramachandran *et al.*, « Targeting a Proteinase-Activated Receptor 4 (PAR4) Carboxyl Terminal Motif to Regulate Platelet Function », *Mol Pharmacol*, vol. 91, n° 4, p. 287-295, avr. 2017, doi: 10.1124/mol.116.106526.
- [267] C. M. G. Vanderboor, P. E. Thibeault, K. C. J. Nixon, R. Gros, J. Kramer, et R. Ramachandran, « Proteinase-Activated Receptor 4 Activation Triggers Cell Membrane Blebbing through RhoA and β -Arrestin », *Mol Pharmacol*, vol. 97, n° 6, p. 365-376, juin 2020, doi: 10.1124/mol.119.118232.
- [268] V. A. M. Villar, S. Cuevas, X. Zheng, et P. A. Jose, « Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts », *Methods Cell Biol*, vol. 132, p. 3-23, 2016, doi: 10.1016/bs.mcb.2015.11.008.
- [269] I. Lee-Rivera, E. López, et A. M. López-Colomé, « Diversification of PAR signaling through receptor crosstalk », *Cellular & Molecular Biology Letters*, vol. 27, n° 1, p. 77, sept. 2022, doi: 10.1186/s11658-022-00382-0.
- [270] M. Nakanishi-Matsui, Y.-W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman, et S. R. Coughlin, « PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin », *Nature*, vol. 404, n° 6778, Art. n° 6778, avr. 2000, doi: 10.1038/35007085.
- [271] A. Bah, Z. Chen, L. A. Bush-Pelc, F. S. Mathews, et E. Di Cera, « Crystal structures of murine thrombin in complex with the extracellular fragments of murine protease-activated receptors PAR3 and PAR4 », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 28, p. 11603-11608, juill. 2007, doi: 10.1073/pnas.0704409104.
- [272] S. Seeley, L. Covic, S. L. Jacques, J. Sudmeier, J. D. Baleja, et A. Kuliopulos, « Structural basis for thrombin activation of a protease-activated receptor: inhibition of intramolecular liganding », *Chem Biol*, vol. 10, n° 11, p. 1033-1041, nov. 2003, doi: 10.1016/j.chembiol.2003.10.014.
- [273] H. Lin et J. Trejo, « Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits β -arrestin-mediated endosomal signaling », *J Biol Chem*, vol. 288, n° 16, p. 11203-11215, avr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.439950.
- [274] A. Jarry *et al.*, « PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 364, n° 3, p. 689-694, déc. 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.073.
- [275] D. Darmoul, J.-C. Marie, H. Devaud, V. Gratio, et M. Laburthe, « Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2 », *Br J Cancer*, vol. 85, n° 5, p. 772-779, sept. 2001, doi: 10.1054/bjoc.2001.1976.
- [276] R. Colognato, J. R. Slupsky, M. Jendrach, L. Burysek, T. Syrovets, et T. Simmet, « Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells », *Blood*, vol. 102, n° 7, p. 2645-2652, oct. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-08-2497.

- [277] V. Shpacovitch, M. Feld, M. D. Hollenberg, T. A. Luger, et M. Steinhoff, « Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity », *J Leukoc Biol*, vol. 83, n° 6, p. 1309-1322, juin 2008, doi: 10.1189/jlb.0108001.
- [278] M. R. D'andrea, C. J. Rogahn, et P. Andrade-Gordon, « Localization of Protease-Activated Receptors -1 and -2 in Human Mast Cells: Indications for an Amplified Mast Cell Degranulation Cascade », *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 75, n° 2, p. 85-90, janv. 2000, doi: 10.3109/10520290009064152.
- [279] C. U. Corvera *et al.*, « Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. », *J Clin Invest*, vol. 100, n° 6, p. 1383-1393, sept. 1997, doi: 10.1172/JCI119658.
- [280] A. Zhao *et al.*, « Immune Regulation of Protease-Activated Receptor-1 Expression in Murine Small Intestine during *Nippostrongylus brasiliensis* Infection », *J Immunol*, vol. 175, n° 4, p. 2563-2569, août 2005.
- [281] Y. Xie *et al.*, « Elafin Reverses Intestinal Fibrosis by Inhibiting Cathepsin S-Mediated Protease-Activated Receptor 2 », *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 14, n° 4, p. 841-876, janv. 2022, doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.06.011.
- [282] M. Steinhoff *et al.*, « Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism », *Nat Med*, vol. 6, n° 2, Art. n° 2, févr. 2000, doi: 10.1038/72247.
- [283] V. Vellani *et al.*, « Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones », *Mol Pain*, vol. 6, p. 61, sept. 2010, doi: 10.1186/1744-8069-6-61.
- [284] C. Desormeaux *et al.*, « Protease-activated receptor 1 is implicated in irritable bowel syndrome mediators-induced signaling to thoracic human sensory neurons », *Pain*, vol. 159, n° 7, p. 1257-1267, juill. 2018, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001208.
- [285] W.-J. Zhu *et al.*, « Expression of mRNA for four subtypes of the proteinase-activated receptor in rat dorsal root ganglia », *Brain Research*, vol. 1041, n° 2, p. 205-211, avr. 2005, doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.018.
- [286] J. R. F. Hockley *et al.*, « Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron », *Gut*, vol. 68, n° 4, p. 633-644, avr. 2019, doi: 10.1136/gutjnl-2017-315631.
- [287] S. K. Bohm *et al.*, « Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2 », *Biochem J*, vol. 314 (Pt 3), n° Pt 3, p. 1009-1016, mars 1996, doi: 10.1042/bj3141009.
- [288] C. Lau, C. Lytle, D. S. Straus, et K. A. DeFea, « Apical and basolateral pools of proteinase-activated receptor-2 direct distinct signaling events in the intestinal epithelium », *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 300, n° 1, p. C113-C123, janv. 2011, doi: 10.1152/ajpcell.00162.2010.
- [289] N. Cenac *et al.*, « Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2 », *Am J Pathol*, vol. 161, n° 5, p. 1903-1915, nov. 2002, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64466-5.
- [290] W. Kong *et al.*, « Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2 », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, n° 16, p. 8884-8889, août 1997, doi: 10.1073/pnas.94.16.8884.
- [291] D. Darmoul, V. Gratio, H. Devaud, T. Lehy, et M. Laburthe, « Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells », *Am J Pathol*, vol. 162, n° 5, p. 1503-1513, mai 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64283-6.

- [292] M. C. Buresi *et al.*, « Protease-activated receptor-1 stimulates Ca(2+)-dependent Cl(-) secretion in human intestinal epithelial cells », *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 281, n° 2, p. G323-332, août 2001, doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.2.G323.
- [293] C. Reinhardt *et al.*, « Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling », *Nature*, vol. 483, n° 7391, p. 10.1038/nature10893, mars 2012, doi: 10.1038/nature10893.
- [294] M. Sébert *et al.*, « Thrombin modifies growth, proliferation and apoptosis of human colon organoids: a protease-activated receptor 1- and protease-activated receptor 4-dependent mechanism », *Br J Pharmacol*, vol. 175, n° 18, p. 3656-3668, sept. 2018, doi: 10.1111/bph.14430.
- [295] F. Mulè, R. Pizzuti, A. Capparelli, et N. Vergnolle, « Evidence for the presence of functional protease activated receptor 4 (PAR4) in the rat colon », *Gut*, vol. 53, n° 2, p. 229-234, févr. 2004, doi: 10.1136/gut.2003.021899.
- [296] A. Caminero, M. Guzman, J. Libertucci, et A. E. Lomax, « The emerging roles of bacterial proteases in intestinal diseases », *Gut Microbes*, vol. 15, n° 1, p. 2181922, déc. 2023, doi: 10.1080/19490976.2023.2181922.
- [297] J.-P. Motta *et al.*, « Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms », *Nat Commun*, vol. 10, n° 1, p. 1-12, juill. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11140-w.
- [298] C. Rolland-Fourcade *et al.*, « Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome », *Gut*, vol. 66, n° 10, p. 1767-1778, oct. 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312094.
- [299] N. Solà-Tapias, N. Vergnolle, A. Denadai-Souza, et F. Barreau, « The Interplay Between Genetic Risk Factors and Proteolytic Dysregulation in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease », *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 14, n° 8, p. 1149-1161, août 2020, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa033.
- [300] C. S. Weeks *et al.*, « Matrix Metalloproteinase-7 Activation of Mouse Paneth Cell Pro- α -defensins: SER43 \downarrow ILE44 PROTEOLYSIS ENABLES MEMBRANE-DISRUPTIVE ACTIVITY* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n° 39, p. 28932-28942, sept. 2006, doi: 10.1074/jbc.M602041200.
- [301] J. Beumer *et al.*, « Mapping prohormone processing by proteases in human enteroendocrine cells using genetically engineered organoid models », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 119, n° 46, p. e2212057119, nov. 2022, doi: 10.1073/pnas.2212057119.
- [302] J. Q. van der Merwe, F. Moreau, et W. K. MacNaughton, « Protease-activated receptor-2 stimulates intestinal epithelial chloride transport through activation of PLC and selective PKC isoforms », *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 296, n° 6, p. G1258-1266, juin 2009, doi: 10.1152/ajpgi.90425.2008.
- [303] K. Kunzelmann, R. Schreiber, J. König, et M. Mall, « Ion transport induced by proteinase-activated receptors (PAR2) in colon and airways », *Cell Biochem Biophys*, vol. 36, n° 2-3, p. 209-214, 2002, doi: 10.1385/CBB:36:2-3:209.
- [304] A. Schütte *et al.*, « Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, n° 34, p. 12396-12401, août 2014, doi: 10.1073/pnas.1407597111.
- [305] E. Fekete *et al.*, « *Giardia duodenalis* cysteine proteases cleave proteinase-activated receptor-2 to regulate intestinal goblet cell mucin gene expression », *International*

- Journal for Parasitology*, vol. 52, n° 5, p. 285-292, avr. 2022, doi: 10.1016/j.ijpara.2021.11.011.
- [306] A. Kawabata *et al.*, « The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection », *J Clin Invest*, vol. 107, n° 11, p. 1443-1450, juin 2001.
- [307] K. List *et al.*, « Epithelial integrity is maintained by a matriptase-dependent proteolytic pathway », *Am J Pathol*, vol. 175, n° 4, p. 1453-1463, oct. 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.090240.
- [308] M. S. Buzza *et al.*, « Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine », *PNAS*, vol. 107, n° 9, p. 4200-4205, mars 2010, doi: 10.1073/pnas.0903923107.
- [309] R. Al-Sadi *et al.*, « MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 316, n° 2, p. G278-G290, févr. 2019, doi: 10.1152/ajpgi.00126.2018.
- [310] R. J. Obiso, A. O. Azghani, et T. D. Wilkins, « The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells », *Infect Immun*, vol. 65, n° 4, p. 1431-1439, avr. 1997, doi: 10.1128/iai.65.4.1431-1439.1997.
- [311] A.-M. Coelho, N. Vergnolle, B. Guiard, J. Fioramonti, et L. Bueno, « Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats », *Gastroenterology*, vol. 122, n° 4, p. 1035-1047, avr. 2002, doi: 10.1053/gast.2002.32387.
- [312] A. C. Chin, W. Y. Lee, A. Nusrat, N. Vergnolle, et C. A. Parkos, « Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration », *J Immunol*, vol. 181, n° 8, p. 5702-5710, oct. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5702.
- [313] N. Cenac *et al.*, « PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways », *J Physiol*, vol. 558, n° Pt 3, p. 913-925, août 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2004.061721.
- [314] A. C. Chin, N. Vergnolle, W. K. MacNaughton, J. L. Wallace, M. D. Hollenberg, et A. G. Buret, « Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, n° 19, p. 11104-11109, sept. 2003, doi: 10.1073/pnas.1831452100.
- [315] A. Jablaoui *et al.*, « Fecal Serine Protease Profiling in Inflammatory Bowel Diseases », *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, p. 21, févr. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.00021.
- [316] A. Denadai-Souza *et al.*, « Functional Proteomic Profiling of Secreted Serine Proteases in Health and Inflammatory Bowel Disease », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, p. 7834, mai 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26282-y.
- [317] N. Solà Tapias *et al.*, « Colitis Linked to Endoplasmic Reticulum Stress Induces Trypsin Activity Affecting Epithelial Functions », *J Crohns Colitis*, vol. 15, n° 9, p. 1528-1541, sept. 2021, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab035.
- [318] J.-P. Motta *et al.*, « Increased Mucosal Thrombin is Associated with Crohn's Disease and Causes Inflammatory Damage through Protease-activated Receptors Activation », *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 15, n° 5, p. 787-799, mai 2021, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa229.

- [319] W. Zhang, G. Teng, T. Wu, Y. Tian, et H. Wang, « Expression and Clinical Significance of Elafin in Inflammatory Bowel Disease », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 23, n° 12, p. 2134-2141, déc. 2017, doi: 10.1097/MIB.0000000000001252.
- [320] A. Jarry *et al.*, « Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN- γ axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease », *Lab Invest*, vol. 95, n° 10, Art. n° 10, oct. 2015, doi: 10.1038/labinvest.2015.89.
- [321] B. Flood *et al.*, « Altered expression of caspases-4 and -5 during inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Diagnostic and therapeutic potential », *Clin Exp Immunol*, vol. 181, n° 1, p. 39-50, juill. 2015, doi: 10.1111/cei.12617.
- [322] A. Visekruna *et al.*, « Comparative Expression Analysis and Characterization of 20S Proteasomes in Human Intestinal Tissues: The Proteasome Pattern as Diagnostic Tool for IBD Patients », *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, n° 4, p. 526-533, avr. 2009, doi: 10.1002/ibd.20805.
- [323] I. Cleyne *et al.*, « Genetic evidence supporting the association of protease and protease inhibitor genes with inflammatory bowel disease: a systematic review », *PLoS One*, vol. 6, n° 9, p. e24106, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0024106.
- [324] U. Meyer-Hoffert et O. Wiedow, « Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses », *Curr Opin Hematol*, vol. 18, n° 1, p. 19-24, janv. 2011, doi: 10.1097/MOH.0b013e32834115d1.
- [325] M. Schmid, K. Fellermann, P. Fritz, O. Wiedow, E. F. Stange, et J. Wehkamp, « Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease », *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, n° 4, p. 907-915, 2007, doi: 10.1189/jlb.0906581.
- [326] A. Andoh *et al.*, « Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease », *Oncol Rep*, vol. 16, n° 1, p. 103-107, juill. 2006.
- [327] G. T. Macfarlane, C. Allison, S. A. Gibson, et J. H. Cummings, « Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine », *J Appl Bacteriol*, vol. 64, n° 1, p. 37-46, janv. 1988, doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb02427.x.
- [328] M. Hoffmann, S. C. Kim, R. B. Sartor, et D. Haller, « Enterococcus faecalis strains differentially regulate Alix/AIP1 protein expression and ERK 1/2 activation in intestinal epithelial cells in the context of chronic experimental colitis », *J Proteome Res*, vol. 8, n° 3, p. 1183-1192, mars 2009, doi: 10.1021/pr800785m.
- [329] H. J. Galipeau *et al.*, « Novel Fecal Biomarkers That Precede Clinical Diagnosis of Ulcerative Colitis », *Gastroenterology*, vol. 160, n° 5, p. 1532-1545, avr. 2021, doi: 10.1053/j.gastro.2020.12.004.
- [330] V. Mariaule *et al.*, « Digestive Inflammation: Role of Proteolytic Dysregulation », *Int J Mol Sci*, vol. 22, n° 6, p. 2817, mars 2021, doi: 10.3390/ijms22062817.
- [331] M. Padrines, M. Wolf, A. Walz, et M. Baggiolini, « Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3 », *FEBS Letters*, vol. 352, n° 2, p. 231-235, 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00952-X.
- [332] F. J. Vizoso *et al.*, « Collagenase-3 (MMP-13) expression by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease », *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 41, n° 9, p. 1050-1055, janv. 2006, doi: 10.1080/00365520600554667.
- [333] J. M. Devaney, C. M. Greene, C. C. Taggart, T. P. Carroll, S. J. O'Neill, et N. G. McElvaney, « Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4 », *FEBS Letters*, vol. 544, n° 1-3, p. 129-132, 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00482-4.

- [334] M. A. Saeed *et al.*, « Protease-activated Receptor 1 Plays a Proinflammatory Role in Colitis by Promoting Th17-related Immunity », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 23, n° 4, p. 593-602, avr. 2017, doi: 10.1097/MIB.0000000000001045.
- [335] J.-A. Kim *et al.*, « Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 9, n° 4, p. 224-229, juill. 2003, doi: 10.1097/00054725-200307000-00002.
- [336] Y. Tanaka, F. Sekiguchi, H. Hong, et A. Kawabata, « PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 377, n° 2, p. 622-626, déc. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.018.
- [337] S. Fiorucci *et al.*, « Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, n° 24, p. 13936-13941, nov. 2001, doi: 10.1073/pnas.241377298.
- [338] N. Vergnolle *et al.*, « A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases », *J Clin Invest*, vol. 116, n° 7, p. 2056, juill. 2006, doi: 10.1172/jci21689r1.
- [339] N. Cenac *et al.*, « Proteinase-activated Receptor-1 is an Anti-Inflammatory Signal for Colitis Mediated by a Type 2 Immune Response », *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 11, n° 9, p. 792-798, sept. 2005, doi: 10.1097/01.mib.0000177506.71784.bd.
- [340] C. L. Scudamore, M. A. Jepson, B. H. Hirst, et H. R. Miller, « The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin », *Eur J Cell Biol*, vol. 75, n° 4, p. 321-330, avr. 1998, doi: 10.1016/s0171-9335(98)80065-4.
- [341] N. Steck *et al.*, « Enterococcus faecalis Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation », *Gastroenterology*, vol. 141, n° 3, p. 959-971, sept. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.035.
- [342] L. Liu *et al.*, « Mucus layer modeling of human colonoids during infection with enteroaggregative E. coli », *Sci Rep*, vol. 10, p. 10533, juin 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67104-4.
- [343] M. Dabek *et al.*, « Luminal cathepsin g and protease-activated receptor 4: a duet involved in alterations of the colonic epithelial barrier in ulcerative colitis », *Am J Pathol*, vol. 175, n° 1, p. 207-214, juill. 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080986.
- [344] M. Dabek *et al.*, « Intracolonic infusion of fecal supernatants from ulcerative colitis patients triggers altered permeability and inflammation in mice: role of cathepsin G and protease-activated receptor-4 », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 17, n° 6, p. 1409-1414, juin 2011, doi: 10.1002/ibd.21454.
- [345] K. Bielefeldt, B. Davis, et D. G. Binion, « Pain and Inflammatory Bowel Disease », *Inflamm Bowel Dis*, vol. 15, n° 5, p. 778-788, mai 2009, doi: 10.1002/ibd.20848.
- [346] F. Cattaruzza *et al.*, « Cathepsin S is activated during colitis and causes visceral hyperalgesia by a PAR2-dependent mechanism in mice », *Gastroenterology*, vol. 141, n° 5, p. 1864-1874.e1-3, nov. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.035.
- [347] C. Augé, D. Balz-hara, M. Steinhoff, N. Vergnolle, et N. Cenac, « Protease-activated receptor-4 (PAR4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity », *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 21, n° 11, p. 1189-e107, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01310.x.
- [348] S. Asfaha, V. Brussee, K. Chapman, D. W. Zochodne, et N. Vergnolle, « Proteinase-activated receptor-1 agonists attenuate nociception in response to noxious stimuli », *Br J Pharmacol*, vol. 135, n° 5, p. 1101-1106, mars 2002, doi: 10.1038/sj.bjp.0704568.

- [349] H. ISHIGURO *et al.*, « PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF BICARBONATE SECRETION BY PANCREATIC DUCT EPITHELIUM », *Nagoya J Med Sci*, vol. 74, n° 1-2, p. 1-18, févr. 2012.
- [350] M. V. Singer et E. Niebergall-Roth, « Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: Role of enteropancreatic reflexes and cholecystokinin », *Cell Biology International*, vol. 33, n° 1, p. 1-9, 2009, doi: 10.1016/j.cellbi.2008.09.008.
- [351] M. Grønberg *et al.*, « Comprehensive Proteomic Analysis of Human Pancreatic Juice », *J. Proteome Res.*, vol. 3, n° 5, p. 1042-1055, oct. 2004, doi: 10.1021/pr0499085.
- [352] M. C. Geokas et H. Rinderknecht, « Free proteolytic enzymes in pancreatic juice of patients with acute pancreatitis », *Digest Dis Sci*, vol. 19, n° 7, p. 591-598, juill. 1974, doi: 10.1007/BF01073012.
- [353] W. Dc et L. Me, « Human pancreatic digestive enzymes », *Digestive diseases and sciences*. Consulté le: 12 octobre 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17205399/>
- [354] J. Carrère, C. Figarella, O. Guy, et J. P. Thouvenot, « Human pancreatic chymotrypsinogen A: a non-competitive enzyme immunoassay, and molecular forms in serum and amniotic fluid », *Biochim Biophys Acta*, vol. 883, n° 1, p. 46-53, août 1986, doi: 10.1016/0304-4165(86)90133-9.
- [355] J. Kardos, Á. Bódi, P. Závodszy, I. Venekei, et L. Gráf, « Disulfide-Linked Propeptides Stabilize the Structure of Zymogen and Mature Pancreatic Serine Proteases », *Biochemistry*, vol. 38, n° 38, p. 12248-12257, sept. 1999, doi: 10.1021/bi990764v.
- [356] D. Wang, W. Bode, et R. Huber, « Bovine chymotrypsinogen A X-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 Å resolution », *J Mol Biol*, vol. 185, n° 3, p. 595-624, oct. 1985, doi: 10.1016/0022-2836(85)90074-9.
- [357] M. Kunitz et J. H. Northrop, « CRYSTALLINE CHYMO-TRYPSIN AND CHYMO-TRYPSINOGEN : I. ISOLATION, CRYSTALLIZATION, AND GENERAL PROPERTIES OF A NEW PROTEOLYTIC ENZYME AND ITS PRECURSOR », *J Gen Physiol*, vol. 18, n° 4, p. 433-458, mars 1935, doi: 10.1085/jgp.18.4.433.
- [358] M. Laskowski, « [2] Chymotrypsinogens and chymotrypsins », in *Methods in Enzymology*, vol. 2, Academic Press, 1955, p. 8-26. doi: 10.1016/S0076-6879(55)02166-6.
- [359] L. B. Smillie, A. Furka, N. Nagabhushan, K. J. Stevenson, et C. O. Parkes, « Structure of chymotrypsinogen B compared with chymotrypsinogen A and trypsinogen », *Nature*, vol. 218, n° 5139, p. 343-346, avr. 1968, doi: 10.1038/218343a0.
- [360] N. Tomita *et al.*, « Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic prechymotrypsinogen cDNA », *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 158, n° 2, p. 569-575, janv. 1989, doi: 10.1016/s0006-291x(89)80087-7.
- [361] G. I. Bell, C. Quinto, M. Quiroga, P. Valenzuela, C. S. Craik, et W. J. Rutter, « Isolation and sequence of a rat chymotrypsin B gene », *J Biol Chem*, vol. 259, n° 22, p. 14265-14270, nov. 1984.
- [362] J. Rosendahl *et al.*, « Genome-wide association study identifies inversion in the CTRB1-CTRB2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis », *Gut*, vol. 67, n° 10, p. 1855-1863, oct. 2018, doi: 10.1136/gutjnl-2017-314454.
- [363] B. Z. Németh *et al.*, « Arg236 in human chymotrypsin B2 (CTRB2) is a key determinant of high enzyme activity, trypsinogen degradation capacity, and protection against pancreatitis », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1870, n° 9, p. 140831, sept. 2022, doi: 10.1016/j.bbapap.2022.140831.

- [364] Z. Jancsó, E. Hegyi, et M. Sahin-Tóth, « Chymotrypsin Reduces the Severity of Secretagogue-induced Pancreatitis in Mice », *Gastroenterology*, vol. 155, n° 4, p. 1017-1021, oct. 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2018.06.041.
- [365] J. E. Folk et E. W. Schirmer, « Chymotrypsin C: I. ISOLATION OF THE ZYMOGEN AND THE ACTIVE ENZYME: PRELIMINARY STRUCTURE AND SPECIFICITY STUDIES », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 240, n° 1, p. 181-192, janv. 1965, doi: 10.1016/S0021-9258(18)97633-7.
- [366] A. Tomomura *et al.*, « Molecular cloning and expression of human caldecrin », *FEBS Lett*, vol. 386, n° 1, p. 26-28, mai 1996, doi: 10.1016/0014-5793(96)00377-8.
- [367] A. Tomomura *et al.*, « Molecular Cloning and Expression of Serum Calcium- decreasing Factor (Caldecrin) (*) », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n° 51, p. 30315-30321, déc. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.51.30315.
- [368] A. Geisz, Z. Jancsó, B. C. Németh, E. Hegyi, et M. Sahin-Tóth, « Natural single-nucleotide deletion in chymotrypsinogen C gene increases severity of secretagogue-induced pancreatitis in C57BL/6 mice », *JCI Insight*, vol. 4, n° 14, p. e129717, juill. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.129717.
- [369] M. Tomomura et A. Tomomura, « Caldecrin: A pancreas-derived hypocalcemic factor, regulates osteoclast formation and function », *World J Biol Chem*, vol. 6, n° 4, p. 358-365, nov. 2015, doi: 10.4331/wjbc.v6.i4.358.
- [370] H. Wang, W. Sha, Z. Liu, et C.-W. Chi, « Effect of chymotrypsin C and related proteins on pancreatic cancer cell migration », *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 43, n° 5, p. 362-371, mai 2011, doi: 10.1093/abbs/gmr022.
- [371] O. H. von Deimling, J. Gröning, et A. Gaa, « Genetic and biochemical characterization of a new chymotrypsin isozyme of the house mouse, CTRA-1 », *Biochem Genet*, vol. 29, n° 11, p. 545-557, déc. 1991, doi: 10.1007/PL00020697.
- [372] J. E. Reseland, F. Larsen, J. Solheim, J. A. Eriksen, L. E. Hanssen, et H. Prydz, « A Novel Human Chymotrypsin-like Digestive Enzyme * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 12, p. 8099-8104, mars 1997, doi: 10.1074/jbc.272.12.8099.
- [373] D. Mosztbacher, Z. Jancsó, et M. Sahin-Tóth, « Loss of chymotrypsin-like protease (CTRL) alters intrapancreatic protease activation but not pancreatitis severity in mice », *Scientific Reports*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, juill. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68616-9.
- [374] S. Genell, B. E. Gustafsson, et K. Ohlsson, « Quantitation of Active Pancreatic Endopeptidases in the Intestinal Contents of Germfree and Conventional Rats », *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 11, n° 8, p. 757-762, déc. 1976, doi: 10.1080/00365521.1976.12097184.
- [375] D. M. Goldberg, R. Campbell, et A. D. Roy, « Binding of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, vol. 167, n° 3, p. 613-615, nov. 1968, doi: 10.1016/0005-2744(68)90053-3.
- [376] M. A. Remtulla, P. R. Durie, et D. M. Goldberg, « Stool chymotrypsin activity measured by a spectrophotometric procedure to identify pancreatic disease in infants », *Clin Biochem*, vol. 19, n° 6, p. 341-347, déc. 1986, doi: 10.1016/s0009-9120(86)80007-8.
- [377] J. S. Smith, I. Ediss, M. A. Mullinger, et A. Bogoch, « Fecal Chymotrypsin and Trypsin Determinations », *Can Med Assoc J*, vol. 104, n° 8, p. 691-697, avr. 1971.
- [378] Á. Bódi, G. Kaslik, I. Venekei, et L. Gráf, « Structural determinants of the half-life and cleavage site preference in the autolytic inactivation of chymotrypsin », *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, n° 23, p. 6238-6246, 2001, doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02578.x.

- [379] R. Szmola et M. Sahin-Tóth, « Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n° 27, p. 11227-11232, juill. 2007, doi: 10.1073/pnas.0703714104.
- [380] C. T. J. C, et S.-N. C, « Digestive enzymes in the germ-free animal », *Reproduction, nutrition, développement*, vol. 21, n° 3, 1981, doi: 10.1051/rnd:19810301.
- [381] H. Yoon *et al.*, « Increased Pancreatic Protease Activity in Response to Antibiotics Impairs Gut Barrier and Triggers Colitis », *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 6, n° 3, p. 370-388.e3, 2018, doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.05.008.
- [382] X.-C. Wang, K. I. Strauss, Q. N. Ha, S. Nagula, M. E. Wolpoe, et D. M. Jacobowitz, « Chymotrypsin gene expression in rat peripheral organs », *Cell Tissue Res*, vol. 292, n° 2, p. 345-354, avr. 1998, doi: 10.1007/s004410051065.
- [383] E. Hegyi et M. Sahin-Tóth, « Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway », *Dig Dis Sci*, vol. 62, n° 7, p. 1692-1701, 2017, doi: 10.1007/s10620-017-4601-3.
- [384] J. Rosendahl *et al.*, « Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis », *Nat Genet*, vol. 40, n° 1, p. 78-82, janv. 2008, doi: 10.1038/ng.2007.44.
- [385] A. Szabó et M. Sahin-Tóth, « Determinants of chymotrypsin C cleavage specificity in the calcium binding loop of human cationic trypsinogen », *FEBS J*, vol. 279, n° 23, p. 4283-4292, déc. 2012, doi: 10.1111/febs.12018.
- [386] J. Mayerle, M. Sendler, E. Hegyi, G. Beyer, M. M. Lerch, et M. Sahin-Tóth, « Genetics and pathophysiology of pancreatitis », *Gastroenterology*, vol. 156, n° 7, p. 1951-1968.e1, mai 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.081.
- [387] V. A. Swystun *et al.*, « Serine proteases decrease intestinal epithelial ion permeability by activation of protein kinase C ζ », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 297, n° 1, p. G60-G70, juill. 2009, doi: 10.1152/ajpgi.00096.2009.
- [388] N. Sarkar et L. S. Fosdick, « Mode of Action of Chymotrypsin on Pleural Inflammation », *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 146, n° 2, p. 258-264, nov. 1964.
- [389] D. Shah et K. Mital, « The Role of Trypsin:Chymotrypsin in Tissue Repair », *Adv Ther*, vol. 35, n° 1, p. 31-42, 2018, doi: 10.1007/s12325-017-0648-y.
- [390] A. Ghaffarinia, C. Jalili, F. Riazi-Rad, A. Mostafaie, S. Parvaneh, et N. Pakravan, « Anti-inflammatory effect of chymotrypsin to autoimmune response against CNS is dose-dependent », *Cellular Immunology*, vol. 292, n° 1, p. 102-108, nov. 2014, doi: 10.1016/j.cellimm.2014.09.007.
- [391] M. Bens *et al.*, « Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 270, n° 6, p. C1666-C1674, juin 1996, doi: 10.1152/ajpcell.1996.270.6.C1666.
- [392] L. F. Gomides, I. D. Duarte, R. G. Ferreira, A. C. Perez, J. N. Francischi, et A. Klein, « Proteinase-activated receptor-4 plays a major role in the recruitment of neutrophils induced by trypsin or carrageenan during pleurisy in mice », *Pharmacology*, vol. 89, n° 5-6, p. 275-282, 2012, doi: 10.1159/000337378.
- [393] X. Han, S. Aiyer, J. Ismail, et M. T. Nieman, « Protease-Activated Receptors (PARs) », in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, S. Offermanns et W. Rosenthal, Éd., Cham: Springer International Publishing, 2021, p. 1277-1288. doi: 10.1007/978-3-030-57401-7_10078.

- [394] A. S. ten Hove, J. Seppen, et W. J. de Jonge, « Neuronal innervation of the intestinal crypt », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 320, n° 2, p. G193-G205, févr. 2021, doi: 10.1152/ajpgi.00239.2020.
- [395] E. Ostrowska et G. Reiser, « The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, n° 6, p. 970-981, mars 2008, doi: 10.1007/s00018-008-7555-y.
- [396] L. de Garavilla *et al.*, « Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism », *Br J Pharmacol*, vol. 133, n° 7, p. 975-987, août 2001, doi: 10.1038/sj.bjp.0704152.
- [397] R. S. Saad, Z. Ghorab, M. A. Khalifa, et M. Xu, « CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations », *World J Gastrointest Surg*, vol. 3, n° 11, p. 159-166, nov. 2011, doi: 10.4240/wjgs.v3.i11.159.
- [398] I. Chatterjee *et al.*, « CDX2 upregulates SLC26A3 gene expression in intestinal epithelial cells », *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 313, n° 3, p. G256-G264, sept. 2017, doi: 10.1152/ajpgi.00108.2017.
- [399] J. Hou, A. S. Gomes, D. L. Paul, et D. A. Goodenough, « Study of claudin function by RNA interference », *J Biol Chem*, vol. 281, n° 47, p. 36117-36123, nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M608853200.
- [400] J. Varani, S. D. McClintock, et M. N. Aslam, « Organoid culture to study epithelial cell differentiation and barrier formation in the colon: bridging the gap between monolayer cell culture and human subject research », *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 57, n° 2, p. 174-190, févr. 2021, doi: 10.1007/s11626-020-00534-6.
- [401] M. S. Engelstoft *et al.*, « Research Resource: A Chromogranin A Reporter for Serotonin and Histamine Secreting Enteroendocrine Cells », *Mol Endocrinol*, vol. 29, n° 11, p. 1658-1671, nov. 2015, doi: 10.1210/me.2015-1106.
- [402] H. D. Nguyen, H. M. Aljamaei, et A. W. Stadnyk, « The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis », *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, vol. 12, n° 4, p. 1343-1352, juill. 2021, doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.07.005.
- [403] N. Cenac *et al.*, « Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome », *J Clin Invest*, vol. 117, n° 3, p. 636-647, mars 2007, doi: 10.1172/JCI29255.
- [404] G. Boschetti, « Quand et comment utiliser la calprotectine fécale au cours des MICI ? ».
- [405] A. Kriaa, A. Jablaoui, H. Mkaouar, N. Akermi, E. Maguin, et M. Rhimi, « Serine proteases at the cutting edge of IBD: Focus on gastrointestinal inflammation », *The FASEB Journal*, vol. 34, n° 6, p. 7270-7282, 2020, doi: 10.1096/fj.202000031RR.
- [406] J. P. van de Merwe et G. J. Mol, « Levels of trypsin and alpha-chymotrypsin in feces from patients with Crohn's disease », *Digestion*, vol. 24, n° 1, p. 1-4, 1982, doi: 10.1159/000198767.
- [407] D. Bustos *et al.*, « Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis », *Medicina (B Aires)*, vol. 58, n° 3, p. 262-264, 1998.
- [408] S. Avakian, « FURTHER STUDIES ON THE ABSORPTION OF CHYMOTRYPSIN », *Clin Pharmacol Ther*, vol. 5, p. 712-715, 1964, doi: 10.1002/cpt196456part1712.
- [409] B. L. Kabacoff, A. Wohlman, M. Umhey, et S. Avakian, « Absorption of Chymotrypsin from the Intestinal Tract », *Nature*, vol. 199, n° 4895, Art. n° 4895, août 1963, doi: 10.1038/199815a0.

- [410] S. C. Pearce *et al.*, « Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types », *BMC Biol*, vol. 16, n° 1, p. 19, févr. 2018, doi: 10.1186/s12915-018-0481-z.
- [411] A. Tsakmaki, P. Fonseca Pedro, P. Pavlidis, B. Hayee, et G. A. Bewick, « ISX-9 manipulates endocrine progenitor fate revealing conserved intestinal lineages in mouse and human organoids », *Molecular Metabolism*, vol. 34, p. 157-173, avr. 2020, doi: 10.1016/j.molmet.2020.01.012.
- [412] N. Vergnolle, « Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases », *Gut*, vol. 65, n° 7, p. 1215-1224, juill. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2015-309147.
- [413] N. W. Bunnett, « Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain », *Semin Thromb Hemost*, vol. 32 Suppl 1, p. 39-48, avr. 2006, doi: 10.1055/s-2006-939553.
- [414] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, et J. E. de Vries, « Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes », *J Exp Med*, vol. 174, n° 5, p. 1209-1220, nov. 1991, doi: 10.1084/jem.174.5.1209.
- [415] R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, et W. Müller, « Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis », *Cell*, vol. 75, n° 2, p. 263-274, oct. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)80068-P.
- [416] M. Quiros *et al.*, « Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling », *J Clin Invest*, vol. 127, n° 9, p. 3510-3520, nov. 2017, doi: 10.1172/JCI90229.
- [417] D. J. Kominsky *et al.*, « IFN- γ -mediated induction of an apical IL-10 receptor on polarized intestinal epithelia », *J Immunol*, vol. 192, n° 3, p. 1267-1276, févr. 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1301757.
- [418] L. Zheng *et al.*, « Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2 », *The Journal of Immunology*, vol. 199, n° 8, p. 2976-2984, oct. 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1700105.
- [419] X. Sun *et al.*, « Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition », *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 294, n° 1, p. G139-147, janv. 2008, doi: 10.1152/ajpgi.00386.2007.
- [420] W. de Lau, W. C. Peng, P. Gros, et H. Clevers, « The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength », *Genes Dev.*, vol. 28, n° 4, p. 305-316, févr. 2014, doi: 10.1101/gad.235473.113.
- [421] S. Khaloian *et al.*, « Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence », *Gut*, vol. 69, n° 11, p. 1939-1951, nov. 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2019-319514.
- [422] L. F. Buttó *et al.*, « Intestinal Stem Cell Niche Defects Result in Impaired 3D Organoid Formation in Mouse Models of Crohn's Disease-like Ileitis », *Stem Cell Reports*, vol. 15, n° 2, p. 389-407, août 2020, doi: 10.1016/j.stemcr.2020.06.017.
- [423] A. H. M. Viswanatha Swamy et P. A. Patil, « Effect of Some Clinically Used Proteolytic Enzymes on Inflammation in Rats », *Indian J Pharm Sci*, vol. 70, n° 1, p. 114-117, 2008, doi: 10.4103/0250-474X.40347.
- [424] B. Latha, M. Ramakrishnan, V. Jayaraman, et M. Babu, « The efficacy of trypsin: chymotrypsin preparation in the reduction of oxidative damage during burn injury », *Burns*, vol. 24, n° 6, p. 532-538, sept. 1998, doi: 10.1016/s0305-4179(98)00066-7.

- [425] N. Yoshida *et al.*, « Interleukin-8 production via protease-activated receptor 2 in human esophageal epithelial cells », *Int J Mol Med*, vol. 19, n° 2, p. 335-340, févr. 2007, doi: 10.3892/ijmm.19.2.335.
- [426] D. Kaiserman *et al.*, « Granzyme K initiates IL-6 and IL-8 release from epithelial cells by activating protease-activated receptor 2 », *PLoS One*, vol. 17, n° 7, p. e0270584, juill. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0270584.
- [427] J. Uwada *et al.*, « Store-operated calcium entry (SOCE) contributes to phosphorylation of p38 MAPK and suppression of TNF- α signalling in the intestinal epithelial cells », *Cellular Signalling*, vol. 63, p. 109358, nov. 2019, doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109358.
- [428] R. Benabid *et al.*, « Neutrophil Elastase Modulates Cytokine Expression », *J Biol Chem*, vol. 287, n° 42, p. 34883-34894, oct. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.361352.
- [429] Q. M. Nhu, K. A. Shirey, M. Pennini, J. Stiltz, et S. N. Vogel, « Proteinase-activated Receptor 2 Activation Promotes an Anti-inflammatory and Alternatively Activated Phenotype in LPS-stimulated Murine Macrophages », *Innate Immun*, vol. 18, n° 2, p. 193-203, avr. 2012, doi: 10.1177/1753425910395044.
- [430] G. R. Sambrano, W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik, et S. R. Coughlin, « Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets », *J Biol Chem*, vol. 275, n° 10, p. 6819-6823, mars 2000, doi: 10.1074/jbc.275.10.6819.
- [431] M. L. Stoller *et al.*, « Neutrophil cathepsin G proteolysis of protease-activated receptor 4 generates a novel, functional tethered ligand », *Blood Adv*, vol. 6, n° 7, p. 2303-2308, avr. 2022, doi: 10.1182/bloodadvances.2021006133.
- [432] M. De bruyn *et al.*, « Proteolytic Cleavage of Bioactive Peptides and Protease-Activated Receptors in Acute and Post-Colitis », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n° 19, Art. n° 19, janv. 2021, doi: 10.3390/ijms221910711.
- [433] J. N. McLaughlin, M. M. Patterson, et A. B. Malik, « Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n° 13, p. 5662-5667, mars 2007, doi: 10.1073/pnas.0700763104.
- [434] A. P. Wiita, J. E. Seaman, et J. A. Wells, « Global Analysis of Cellular Proteolysis by Selective Enzymatic Labeling of Protein N-Termini », *Methods Enzymol*, vol. 544, p. 327-358, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-417158-9.00013-3.
- [435] N. J. Agard, S. Mahrus, J. C. Trinidad, A. Lynn, A. L. Burlingame, et J. A. Wells, « Global kinetic analysis of proteolysis via quantitative targeted proteomics », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, n° 6, p. 1913-1918, févr. 2012, doi: 10.1073/pnas.1117158109.
- [436] D. Zhou *et al.*, « Chymotrypsin both directly modulates bacterial growth and asserts ampicillin degradation-mediated protective effect on bacteria », *Ann Microbiol*, vol. 63, n° 2, Art. n° 2, juin 2013, doi: 10.1007/s13213-012-0512-x.
- [437] C. Cattò, F. Secundo, G. James, F. Villa, et F. Cappitelli, « α -Chymotrypsin Immobilized on a Low-Density Polyethylene Surface Successfully Weakens Escherichia coli Biofilm Formation », *Int J Mol Sci*, vol. 19, n° 12, p. 4003, déc. 2018, doi: 10.3390/ijms19124003.
- [438] H. Kallio, M. Hilvo, A. Rodriguez, E.-H. Lappalainen, A.-M. Lappalainen, et S. Parkkila, « Global transcriptional response to carbonic anhydrase IX deficiency in the mouse stomach », *BMC Genomics*, vol. 11, p. 397, juin 2010, doi: 10.1186/1471-2164-11-397.
- [439] J. H. Saunders et K. G. Wormsley, « Pancreatic extracts in the treatment of pancreatic exocrine insufficiency. », *Gut*, vol. 16, n° 2, p. 157-162, févr. 1975, doi: 10.1136/gut.16.2.157.

- [440] A. Allen et G. Flemström, « Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 288, n° 1, p. C1-C19, janv. 2005, doi: 10.1152/ajpcell.00102.2004.
- [441] N. Kawao *et al.*, « Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the rat gastric mucosa: immunolocalization and facilitation of pepsin/pepsinogen secretion », *Br J Pharmacol*, vol. 135, n° 5, p. 1292-1296, mars 2002, doi: 10.1038/sj.bjp.0704562.
- [442] Q. Miao *et al.*, « Chymotrypsin B Cached in Rat Liver Lysosomes and Involved in Apoptotic Regulation through a Mitochondrial Pathway », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 13, p. 8218-8228, mars 2008, doi: 10.1074/jbc.M709789200.
- [443] Y. E., Q. Yu, T. Sun, H. Xue, X. Zhao, et H. Zheng, « The relationship between pepsinogen C and gastric carcinogenesis: a transgene and population study », *BMC Cancer*, vol. 23, n° 1, p. 520, juin 2023, doi: 10.1186/s12885-023-11020-z.
- [444] R. Vitali *et al.*, « Proteomic Analysis Identifies Three Reliable Biomarkers of Intestinal Inflammation in the Stools of Patients With Inflammatory Bowel Disease », *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 17, n° 1, p. 92-102, janv. 2023, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjac110.
- [445] M. F. Neurath et S. P. L. Travis, « Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review », *Gut*, vol. 61, n° 11, p. 1619-1635, nov. 2012, doi: 10.1136/gutjnl-2012-302830.
- [446] R. M. Lovell et A. C. Ford, « Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis », *Clin Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, n° 7, p. 712-721.e4, juill. 2012, doi: 10.1016/j.cgh.2012.02.029.
- [447] P. Enck *et al.*, « Irritable bowel syndrome », *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, n° 1, Art. n° 1, mars 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.14.
- [448] K. Gecse *et al.*, « Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity », *Gut*, vol. 57, n° 5, p. 591-599, mai 2008, doi: 10.1136/gut.2007.140210.
- [449] A. Annaházi *et al.*, « Luminal Cysteine-Proteases Degrade Colonic Tight Junction Structure and Are Responsible for Abdominal Pain in Constipation-Predominant IBS », *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, vol. 108, n° 8, p. 1322, août 2013, doi: 10.1038/ajg.2013.152.
- [450] S. Edogawa *et al.*, « Serine proteases as luminal mediators of intestinal barrier dysfunction and symptom severity in irritable bowel syndrome », *Gut*, vol. 69, n° 1, p. 62-73, janv. 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2018-317416.
- [451] A. L. Edwinson *et al.*, « Gut microbial β -glucuronidases regulate host luminal proteases and are depleted in irritable bowel syndrome », *Nat Microbiol*, vol. 7, n° 5, p. 680-694, mai 2022, doi: 10.1038/s41564-022-01103-1.

Abstract

In the gut, the epithelium is constantly exposed to a wide variety of proteolytic enzymes originating from the microbiota, host mucosa or host secretion products, including the pancreatic juice. More than simple catabolic enzymes, proteases play a key role for digestive health, ensuring many physiological functions. Some proteases are able to act as true signaling mediators by activating a family of cell surface receptors called Protease-Activated Receptors (PARs). This family includes 4 members (PAR1-4) whose activation has pleiotropic effects and which are expressed by many cell types in the gut, including epithelial cells. In this context, a complete identification of the actors involved in proteolytic signaling is therefore a major issue to better understand the intestinal physiology.

The work presented in this manuscript aimed to characterize the function of chymotrypsin in intestinal homeostasis. This enzyme is a pancreatic protease essentially known to be involved in food digestion. Being abundantly secreted into the intestinal lumen, our work showed that active chymotrypsin was also detectable in the vicinity of the murine and human intestinal mucosa. We then characterized the potential effects of chymotrypsin on the intestinal epithelium, especially via a possible activation of PARs.

Our pharmacological studies evidenced that this enzyme was able to cleave the PAR1 and PAR2 receptors, both expressed by intestinal epithelial cells. In addition, we identified that chymotrypsin is able to activate calcium and ERK1/2 signaling pathways through PAR2, in intestinal epithelial cell lines. Conversely, our results show that chymotrypsin disarms PAR1, hereby preventing further activation of the receptor by its canonical agonist thrombin.

We then addressed the functional effects of chymotrypsin on intestinal epithelial cells *in vitro*. Treatment of human colonic organoids with chymotrypsin promoted the expression of several factors (*IL10*, *MUC2*, *LGR5*, *CHGA*) involved in the protection and maintenance of the epithelial barrier function, without affecting pro-inflammatory markers. This suggests that chymotrypsin could exert protective effects on the intestinal epithelium. Moreover, the induction of *IL10* by chymotrypsin appears to be dependent on the PAR2 receptor, indicating functional effects of the chymotrypsin-PAR2 axis.

In the past, several studies reported the involvement of proteolytic overactivity in the pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases (IBD). Hence, we explored the regulation of chymotrypsin in the context of intestinal inflammation. In a human cohort, we observed that fecal chymotrypsin activity was significantly increased in IBD patients compared to healthy donors. This increase was specifically found in patients with clinically active disease. These preliminary results pave the way for further studies examining in detail the role of this protease in pathological contexts.

Furthermore, we also investigated a potential extra-pancreatic expression of chymotrypsin, by the digestive mucosa. In both human and murine tissues, we found that several forms of chymotrypsin were detected in the intestinal epithelium but also in the stomach, opening new perspectives on the functions of this enzyme within these tissues.

In conclusion, our work allowed to identify chymotrypsin as a new regulator of proteolytic signalling in the GI tract, whose functions go well beyond its digestive implications. Added to the existing literature, our results shed new light on the importance of luminal proteases in the complex interactions that govern intestinal homeostasis.

Résumé

L'épithélium intestinal est exposé à un grand nombre d'enzymes protéolytiques pouvant provenir des sécrétions pancréatiques, du microbiote ou de la muqueuse de l'hôte. Plus que de simples enzymes cataboliques, les protéases jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale en assurant des fonctions très variées. Certaines d'entre elles sont notamment capables d'activer une famille de récepteurs membranaires : les Récepteurs Activés par les Protéases (PARs), qui comprennent 4 membres (PAR1-4). Ils sont exprimés par de nombreux types cellulaires dans l'intestin, y compris les cellules épithéliales, et ont des effets pléiotropes. Une connaissance fine des acteurs de la signalisation protéolytique est donc un enjeu majeur pour mieux comprendre la physiologie intestinale.

Les travaux conduits au cours de cette thèse se sont attachés à caractériser le rôle de la chymotrypsine, une protéase pancréatique essentiellement connue pour son rôle digestif, dans l'homéostasie intestinale. Abondamment déversée dans la lumière intestinale, nous avons pu montrer que la chymotrypsine était retrouvée sous sa forme active à proximité de la muqueuse intestinale. Nous avons ensuite caractérisé les effets potentiels de cette protéase sur l'épithélium intestinal, notamment via l'activation des récepteurs PARs.

Par des approches pharmacologiques, nous avons mis en évidence que cette enzyme était capable de cliver les récepteurs PAR1 et PAR2, tous deux exprimés par les cellules épithéliales intestinales. Dans des lignées cellulaires, mes travaux ont montré que cette enzyme activait le récepteur PAR2, induisant l'activation d'une signalisation calcique et MAPK intracellulaire. En revanche, elle désarme PAR1, prévenant ainsi son activation par son agoniste canonique, la thrombine. Nous avons ensuite étudié les effets fonctionnels de la chymotrypsine sur l'épithélium intestinal *in vitro*. Le traitement d'organoïdes coliques humains avec de la chymotrypsine promeut l'expression de gènes importants pour le maintien de l'homéostasie épithéliale (*IL10*, *MUC2*, *LGR5*, *CHGA*), sans modifier l'expression de facteurs pro-inflammatoires. Ceci suggère un effet protecteur de cette enzyme vis-à-vis de l'épithélium intestinal. De plus, l'induction de l'expression d'*IL10* par la chymotrypsine semble dépendante du récepteur PAR2, indiquant des effets fonctionnels de l'axe chymotrypsine-PAR2.

En outre, plusieurs études indiquent que la suractivation de certaines protéases contribue à la physiopathologie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI). Nous avons donc exploré la régulation de cette enzyme en contexte d'inflammation intestinale. Dans une cohorte humaine, nous avons observé que l'activité chymotrypsique fécale était significativement augmentée chez des patients atteints de MICI, comparée à des donneurs sains. Cette augmentation était spécifiquement retrouvée chez des patients dont la maladie était cliniquement active. Ces investigations préliminaires ouvrent la voie à des études plus poussées permettant d'explorer précisément le rôle de cette protéase en condition pathologique.

En parallèle, nous avons également recherché une potentielle expression extra-pancréatique de la chymotrypsine, par la muqueuse digestive. Chez L'Homme et la souris, nos analyses ont montré que certaines formes de chymotrypsine étaient détectées dans l'épithélium intestinal mais aussi gastrique, ouvrant de nouvelles perspectives sur les fonctions de cette enzyme au sein de ces tissus.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'identifier la chymotrypsine comme un nouvel acteur de la signalisation protéolytique dans le tractus digestif dont les fonctions vont bien au-delà de ses seules implications digestives. Additionnés à la littérature existante, nos résultats apportent un nouvel éclairage sur l'importance des protéases luminales dans les interactions complexes qui régissent l'homéostasie intestinale.