

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

**INTERACTIONS ENTRE LE SYSTEME NERVEUX  
ENTERIQUE ET LA BARRIERE EPITHELIALE  
INTESTINALE :**

**MODULATION DE LA PRODUCTION NEURONALE DE  
CHIMIOKINES AU COURS DE LA REPOSE  
INFLAMMATOIRE INTESTINALE.**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie - Biologie  
Discipline : Biologie – Médecine – Santé  
Spécialité : Biologie Cellulaire

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Emmanuelle TIXIER**

Le 15 novembre 2005, devant le jury ci-dessous

Président	Dr André BADO, Directeur de Recherches INSERM, Paris
Rapporteurs	Dr Michèle KEDINGER, Directeur de Recherches INSERM, Strasbourg Dr Jean FIORAMONTI, Directeur de Recherches INRA, Toulouse
Examineur	Dr André BADO, Directeur de Recherches INSERM, Paris
Directeurs de thèse	Pr Jean-Paul GALMICHE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes Dr Michel NEUNLIST, Chargé de Recherches INSERM, Nantes

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>7</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>11</b>
<b>1- L'inflammation intestinale</b>	<b>11</b>
1.1- La barrière épithéliale intestinale	11
1.2- Les maladies inflammatoires d'origine infectieuse de l'intestin : cas de l'infection par le <i>Clostridium difficile</i>	17
1.2.1- Les colites induites par le <i>Clostridium difficile</i>	17
1.2.2- Les mécanismes pathogéniques des toxines du <i>C. difficile</i>	18
1.2.3- Altérations de la barrière épithéliale intestinale et inflammation induites par les toxines du <i>C. difficile</i>	22
1.3- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	25
1.3.1- Caractéristiques générales	25
1.3.2- Etiologie des MICI	27
1.3.2.1- Facteurs génétiques	27
1.3.2.2- Facteurs environnementaux	30
1.3.4- Caractéristiques générales de la réponse inflammatoire au cours des MICI	32
1.4- La production de chimiokines au cours de l'inflammation intestinale	34
1.4.1- La famille des chimiokines	34
1.4.2- L'interleukine-8 (IL-8) et sa régulation en physiopathologie intestinale	39
1.4.2.1- Importance de la sécrétion d'IL-8 au cours de processus infectieux	40
1.4.2.2- Régulation de l'expression de L'IL-8	40
1.4.2.3- Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par les médiateurs de l'inflammation intestinale	42
1.4.2.4- Rôles fonctionnels de l'IL-8	46
1.4.3- MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) et sa régulation en physiopathologie	49
1.5- Les interactions entre les cellulaires immunitaires et non immunitaires au cours de l'inflammation intestinale	52
<b>2- Le système nerveux entérique</b>	<b>54</b>
2.1- Découverte du système nerveux entérique (SNE) et historique	54
2.2- Caractéristiques générales du SNE	55
2.2.1- Organisation du SNE	55
2.2.2- Composants cellulaires du SNE	57
2.2.2.1- Les neurones du SNE	57
2.2.2.2- Les cellules gliales du SNE	61
2.2.2.3- Les cellules souches du SNE	64
2.2.3- Développement du SNE	64
2.3- Rôles du SNE dans l'homéostasie intestinale	66
2.3.2- Contrôle de la motricité digestive par le SNE	66
2.3.3- Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par le SNE	70
2.3.3.1- Contrôle du transport vectoriel d'électrolytes et de mucus par le SNE	70
2.3.3.2- Contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium digestif par le SNE	71
2.3.3.3- Contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium par le SNE	73
2.3.3.4- Contrôle du flux sanguin intestinal par le SNE	74
<b>3- Rôles du système nerveux entérique au cours de l'inflammation intestinale</b>	<b>76</b>
3.1- Rôles des voies nerveuses dans l'initiation et le contrôle de l'inflammation intestinale	76
3.1.1- Mise en évidence de l'intervention de voies nerveuses au cours de l'inflammation intestinale	76
3.1.2- Rôles immunomodulateurs potentiels du SNE	78
3.1.2.1- Le rôle immunomodulateur des CGEs	78
3.1.2.2- Contrôle de l'inflammation intestinale par les neuromédiateurs	81
3.1.2.3- Production de cytokines par les neurones entériques	85

3.2- Altérations du SNE induites par l'inflammation	86
3.2.1- Altérations anatomiques	86
3.2.1.1- Altérations structurales des plexus	86
3.2.1.2- Les neuropathies inflammatoires entériques	89
3.2.2- L'inflammation intestinale modifie le contenu en neuromédiateurs des neurones	93
3.2.3- L'inflammation intestinale entraîne une sur-excitabilité des neurones entériques	94
3.3- Troubles fonctionnels liées au SNE au cours de l'inflammation intestinale	98
3.3.1- Altérations de la motricité du tube digestif au cours de l'inflammation	98
3.3.2- Altérations de la sécrétion du tube digestif au cours de l'inflammation	101
<b>SYNTHESE</b>	<b>102</b>
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE ET RESULTATS</b>	<b>104</b>
<b>OBJECTIFS</b>	<b>104</b>
<b>Article 1 : Mise en évidence d'interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine au cours de processus inflammatoires intestinaux : implication du système nerveux entérique dans la sécrétion d'IL-8</b>	<b>106</b>
Résultats complémentaires :	
1- Etude de l'implication potentielle de NF- $\kappa$ B dans la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$ dans les neurones NT2-N	110
2- Etude de l'expression de l'IL-8 dans le plexus myentérique au cours de la rectocolite hémorragique	111
<b>Article 2 : Des interactions neuro-épithéliales régulent l'expression des ARNm et la sécrétion d'IL-8 par les neurones au cours de l'inflammation</b>	<b>112</b>
Résultat complémentaire :	
Etude de l'implication d'interactions neuro-épithéliales dans la régulation de la sécrétion globale d'IL-8 lors de l'infection par la toxine B du <i>C. difficile</i>	116
<b>Article 3 : Les neurones expriment et sécrètent MIP-1<math>\beta</math> en réponse à l'inflammation de l'épithélium</b>	<b>117</b>
Résultats complémentaires :	
Régulation de l'expression par l'IL-1 $\beta$ d'autres chimiokines dans les neurones NT2-N	130
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>131</b>
<b>1- Les deux modèles d'étude des interactions muqueuse/sous-muqueuse colique humaine et des interactions cellules épithéliales intestinales/neurones</b>	<b>131</b>
<b>2- Des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine colique, et en particulier entre les cellules épithéliales et les neurones, régulent la sécrétion et l'expression de l'IL-8 dans les neurones</b>	<b>134</b>
<b>3- L'IL-1<math>\beta</math>, un régulateur de l'expression et de la sécrétion de l'IL-8</b>	<b>136</b>
<b>4- Les neurones produisent des chimiokines au cours de l'inflammation</b>	<b>137</b>
<b>5- Les neurones, en conditions inflammatoires, sont capables d'induire le chimiotactisme de cellules immunitaires par la sécrétion d'IL-8</b>	<b>139</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>144</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>147</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

ACh : acétylcholine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AH : after hyperpolarization

AP-1 : activator protein 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

*C. difficile* : *Clostridium difficile*

CAPE : acide cafféique phenyléthyl ester

CARD 15 : caspase recruitment domain-containing protein

CD X : cluster de différenciation X

Cdc42 : cell-division control protein 42

CE : cellules entérochromaffines

CEI : cellule épithéliale intestinale

CGEs : cellule gliale entérique

CGRP : calcitonin gene-related peptide

ChAT : choline acetyl transferase

CIC : cellule interstitielle de Cajal

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

DNBS : dinitrobenzene sulfonic acid

DSS : dextran sodium sulfate

ELISA : enzyme-linked immunoabsorbent assay

ENA-78 : epithelial neutrophil-activating peptide 78

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FITC : fluorescein isothiocyanate

GDNF : glial-derived neurotrophic factor

GFAP : glial fibrillary-associated protein

GLP-2 : glucagon-like peptide 2

GRO : growth related oncogene

GTP : guanidine triphosphate

ICAM : intercellular adhesion molecule

IFN $\gamma$  : interferon  $\gamma$

IgG : immunoglobuline G

IL-1ra : IL-1 receptor antagonist

IL-X : interleukine-X

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IP-10 : interferon  $\gamma$ -inducible protein 10

IPAN : intrinsic primary afferent neuron

JNK : c-jun kinase

LPS : lipopolysaccharide

MAP kinases : mitogen-activated protein kinase

MAP-1, -2 : microtubule-associated protein -1, -2

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

Mig : monokine induite par l'interféron  $\gamma$

MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  : macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , -1 $\beta$

MIP-2 : macrophage inflammatory protein-2

NF : neurofilament

NF-IL-6 : nuclear factor IL-6

NGF : nerve growth factor

NK : neurokinine

NK-1R : neurokinine-1 receptor

nNOS : neuronal nitric oxide synthase

NO : monoxyde d'azote

NOD : nucleotide-binding oligomerization domain

NOS : nitric oxide synthase

NPY : neuropeptide Y

NSE : neuron specific enolase

NT-3 : neurotrophin-3

PACAP : pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

PAR : proteinase-activated receptor

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PCR : polymerase chain reaction

PGD<sub>2</sub> : prostaglandine D<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>

PKC : protéine kinase C

PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur

PRRs : pattern recognition receptors

RIP2 : Receptor Interacting Protein 2

SERT : sérotonine transporteur

SNE : système nerveux entérique

SOM : somatostatine

SP : substance P

TGF $\beta$  : transforming growth factor

TLR : toll like receptor

TNBS : trinitrobenzene sulfonic acid

TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

TTX : tétrodotoxine

UDP : uridine triphosphate

VIP : vasoactive intestinale peptide

ZO-1, -2, -3 : zonula occludens-1, -2, -3

**- INTRODUCTION GENERALE -**

## INTRODUCTION GENERALE

Le processus de digestion est le processus par lequel les organismes puisent les nutriments indispensables à leur survie dans leur milieu naturel. Des organismes pluricellulaires à l'homme, cette fonction est assurée par le tube digestif, à travers lequel transite le bol alimentaire contenant les nutriments que l'organisme doit absorber (eau, électrolytes, acides aminés, glucides, lipides, ...). La fonction de digestion est régulée par l'action coordonnée des différentes composantes du tube digestif qui contrôlent l'activité motrice et les fonctions de la muqueuse intestinale. La lumière du tube digestif est tapissée de cellules épithéliales intestinales qui forment la barrière épithéliale intestinale. La barrière épithéliale intestinale se situe donc à l'interface entre le milieu intérieur et la lumière intestinale dans laquelle circulent le bol alimentaire, mais également des agents pathogènes et des substances antigéniques. La barrière épithéliale intestinale doit donc assurer la double fonction d'absorption des nutriments et de surveillance/défense de l'organisme contre les éléments nuisibles.

Les fonctions physiologiques du tube digestif sont finement régulées par deux composantes nerveuses : (1) l'une extrinsèque, d'origines sympathique et parasympathique, et (2) l'autre intrinsèque, *i.e.* le système nerveux entérique (SNE). Le SNE régule diverses fonctions intestinales, comme la motricité digestive et la microcirculation sanguine de la muqueuse (Furness, 2000 ; Vanner et Macnaughton, 2004). Le SNE contrôle également directement des fonctions de l'épithélium digestif, telles que la sécrétion d'électrolytes, la prolifération et la perméabilité (Furness, 2000 ; Toumi et coll., 2003 ; Neunlist et coll., 2003a). Cependant, la capacité des cellules épithéliales à moduler des propriétés du SNE à la fois en physiologie et en physiopathologie a été peu explorée.

Lors de processus physiopathologiques, tels ceux générés par des agents pathogènes, l'intestin est le lieu de diverses coopérations entre les différents compartiments cellulaires intestinaux, dont la résultante est l'élimination de l'agent pathogène. La sécrétion d'électrolytes par la muqueuse et l'activité motrice sont ainsi augmentées pour favoriser le rejet du pathogène. Dans certains cas, ces manifestations s'accompagnent d'une réponse inflammatoire de l'intestin. C'est en particulier le cas lors de l'infection par le *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Le *C. difficile* est la principale cause de diarrhées et de colites pseudomembraneuses associées aux antibiotiques. Le *C. difficile* est une bactérie toxigénique dont les effets sont médiés par deux toxines : la toxine A et la toxine B. Les colites qu'elle génère sont caractérisées, d'un point de vue histologique, par la formation d'un infiltrat inflammatoire dense, composé principalement de neutrophiles (Kelly et coll., 1994). Des voies nerveuses extrinsèques sont responsables de l'initiation de l'inflammation et de la sécrétion hydroélectrolytique induites par la toxine A du *C. difficile* (Castagliuolo et col., 1994 ; Mantyh et coll., 2000). Des études suggèrent également que ces voies interviendraient dans le contrôle de l'inflammation intestinale chronique (Domek et coll., 1997 ; Mc Cafferty et coll., 1997). Le SNE joue également un rôle au cours de l'inflammation intestinale, d'origine chronique ou infectieuse. Le SNE subit en effet des altérations de son comportement électrophysiologique (Linden et coll., 2004 ; Xia et coll., 1999) et son codage neurochimique (Schemann et Neunlist, 2004) au cours de processus inflammatoires. Ces altérations pourraient être à l'origine de troubles fonctionnels intestinaux (Mawe et coll., 2004). Cependant, bien que des études montrent que le SNE est la cible de l'inflammation, son rôle dans le contrôle de la réponse inflammation intestinale est inconnu.

Le but de ce travail de thèse était de mettre en évidence, chez l'homme, l'existence d'interactions entre la barrière épithéliale intestinale et le système nerveux entérique, régulant

la sécrétion d'IL-8, en l'absence et en présence d'un stress infectieux inflammatoire (toxine B du *C. difficile*). De plus, nous avons envisagé de déterminer la capacité des neurones entériques à produire des chimiokines au cours de l'inflammation et d'en déterminer un rôle fonctionnel potentiel. Pour ce faire nous avons développé différents modèles de coculture : un modèle de coculture organotypique composé de muqueuse et de sous-muqueuse humaines, et un modèle de coculture cellulaire composé d'une lignée de cellules épithéliales intestinales (Caco-2) et de deux lignées neuronales (NT2-N et SH-SY5Y).

Grâce à ces deux modèles, nous avons mis en évidence l'importance d'interactions entre le SNE et la barrière épithéliale intestinale dans la modulation de la production d'une chimiokine clé de l'inflammation intestinale, *i.e.* l'IL-8. Ainsi, nos travaux montrent :

- (1) l'existence d'interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine diminuant la sécrétion d'IL-8 en situation contrôle, et l'augmentant suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*
- (2) la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8 lors de l'infection par la toxine B du *C. difficile*
- (3) le rôle d'interactions entre les cellules épithéliales intestinales et les neurones modulant la sécrétion de chimiokines (IL-8 et MIP-1 $\beta$ ) et leur expression dans les neurones
- (4) l'implication de l'IL-1 $\beta$  comme médiateur de ces interactions en conditions inflammatoires
- (5) la capacité des neurones à induire le chimiotactisme de cellules mononuclées du sang périphérique en conditions inflammatoires, *via* la sécrétion d'IL-8.

Ce travail de thèse, qui a donné lieu à trois articles (un sous presse, un soumis et un autre en préparation) a permis d'apporter des preuves directes de l'existence d'interactions entre la barrière épithéliale intestinale et le système nerveux entérique au cours de

l'inflammation, régulant la production de chimiokines. Ce travail a également, pour la première fois, montré la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8 au cours de l'inflammation et d'en identifier un rôle fonctionnel potentiel. Ce travail suggère donc la participation du système nerveux entérique dans la régulation de l'inflammation intestinale.

Cette thèse est structurée autour de ces trois articles précédés d'une étude bibliographique présentant le contexte général de l'implication du SNE dans l'inflammation intestinale. Notre étude se situant à l'interface entre plusieurs domaines de recherche (physiologie intestinale, inflammation du tube digestif et neurogastroentérologie) l'étude bibliographique est centrée sur :

- (1) la description générale de l'inflammation intestinale d'origine chronique ou infectieuse (cas du *C. difficile*), en insistant sur la régulation de l'expression de médiateurs inflammatoires (cytokines et chimiokines)
- (2) la caractérisation structurale et fonctionnelle du SNE
- (3) les rôles des voies nerveuses dans le contrôle de l'inflammation intestinale, en présentant notamment les données suggérant l'implication du SNE au cours de l'inflammation intestinale, aussi bien en terme de contrôle de l'inflammation qu'en terme d'altérations subies par le SNE à cause de l'inflammation.

**- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -**

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1- L'inflammation intestinale

Les maladies inflammatoires intestinales sont des pathologies majeures du tube digestif. Il existe principalement deux grands types de pathologies inflammatoires intestinales : les pathologies infectieuses, d'origine virale ou bactérienne, et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les pathologies infectieuses touchent plutôt les populations des pays en voie de développement. Cependant, elles réapparaissent dans les pays développés sous la forme de maladies nosocomiales ou à cause du développement de résistances à des antibiotiques. Les MICI concernent quant à elles principalement les populations des pays développés, notamment les sujets jeunes, et leur incidence est en constante augmentation.

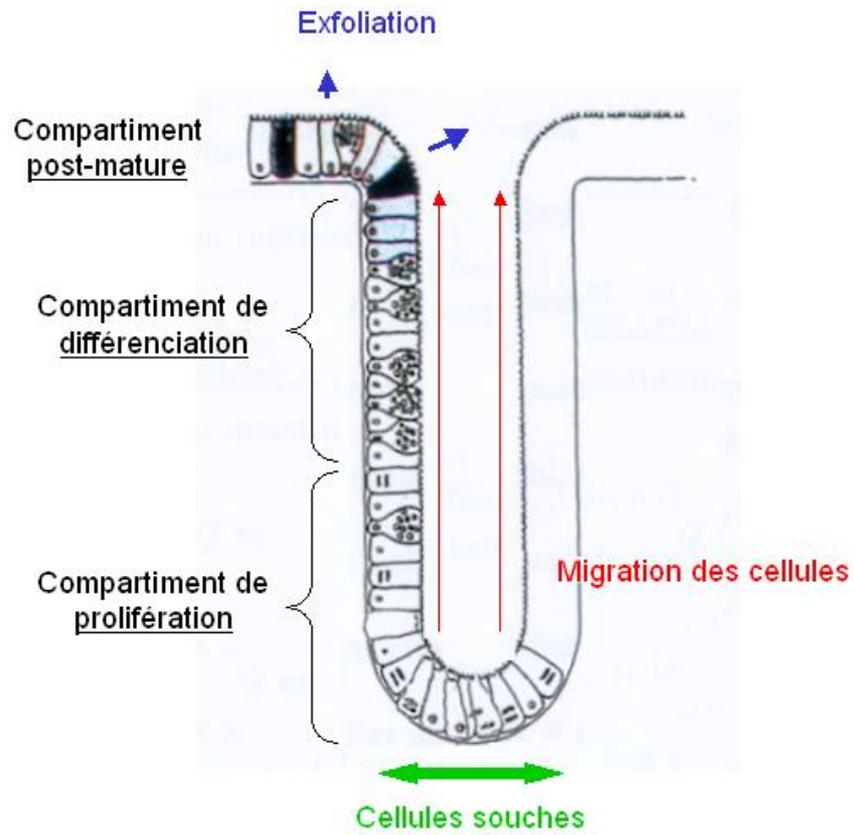
Lors des pathologies inflammatoires intestinales, la muqueuse, et notamment la barrière épithéliale intestinale, est le site majeur du contrôle de l'inflammation.

### 1.1- La barrière épithéliale intestinale

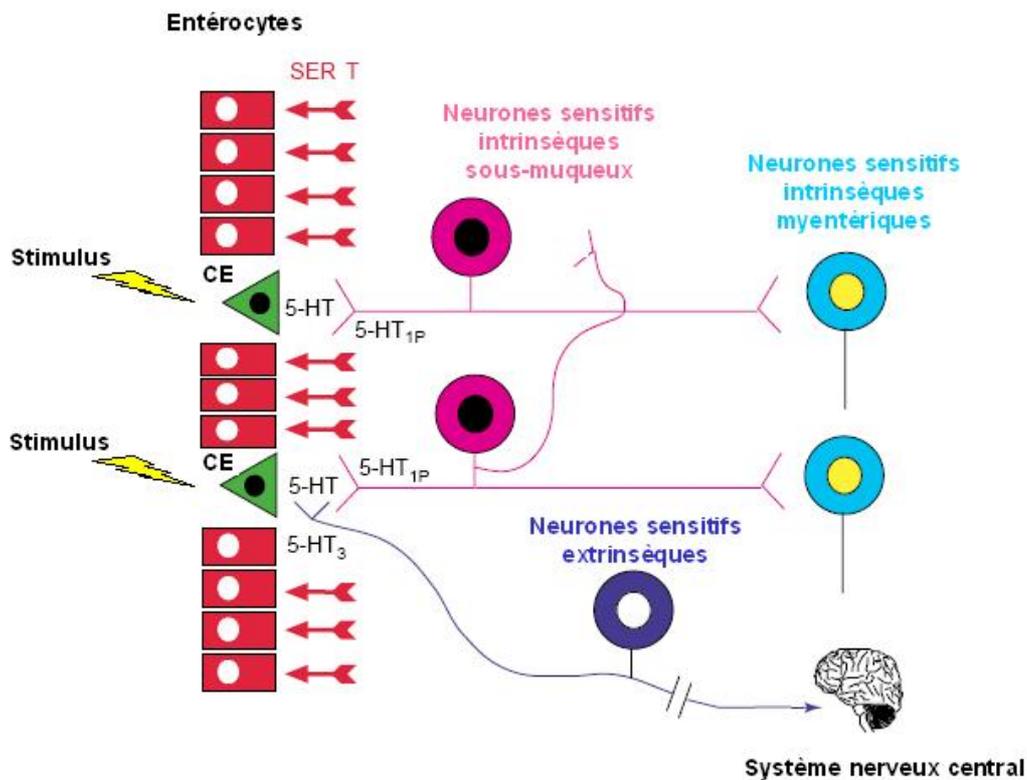
La barrière épithéliale intestinale est située à l'interface entre le milieu « intérieur » et la lumière intestinale dans laquelle peuvent circuler de nombreux pathogènes et/ou des substances antigéniques. Elle est organisée en une monocouche de cellules épithéliales, qui sont des cellules polarisées, dotées de différentes fonctions telles que l'absorption et la sécrétion d'électrolytes, la digestion et l'hydrolyse des aliments. La barrière épithéliale intestinale est une structure dynamique dont le renouvellement est harmonieusement contrôlé par un équilibre entre les compartiments de prolifération, de différenciation et de mort

cellulaire programmée (Potten, 1997, 1998 ; Burgess, 1998). En effet, la muqueuse colique est organisée en cryptes, à la base desquelles est situé le compartiment de prolifération. Le compartiment de différenciation est quant à lui localisé au niveau de l'épithélium de surface, où se trouvent les cellules bien différenciées qui sont de deux types : les cellules absorbantes (colonocytes) et les cellules caliciformes sécrétrices de mucus (Booth et Potten, 2000) (figure 1). La différenciation aboutit également à la formation des cellules sécrétrices de chlore, localisées à la base de la crypte, et des cellules entéroendocrines, disposées dans tous les compartiments de l'épithélium colique. Les cellules entéroendocrines jouent un rôle majeur de cellules sensibles de l'intestin. En effet, elles sont sensibles au contenu de la lumière du tube digestif et sécrètent des médiateurs agissant sur les terminaisons nerveuses, comme la cholécystokinine ou la sérotonine (5-HT). La sérotonine est sécrétée en particulier par les cellules entérochromaffines, en réponse à des changements de la pression (Kim et coll., 2001a) ou de la composition en nutriments du contenu de la lumière intestinale, tels que le glucose (Kim et coll., 2001b ; Raybould et coll., 2002) ou les acides gras à chaîne courte (Fukumoto et coll., 2003). La sérotonine, une fois libérée stimule les terminaisons nerveuses des voies intrinsèques et extrinsèques. La sérotonine est ensuite éliminée grâce au transporteur de la sérotonine (SERT) exprimés à la surface des entérocytes (Gershon, 2003) (figure 2). Dans l'intestin grêle, la différenciation des cellules souches aboutit également à la formation d'un type cellulaire particulier, les cellules de Paneth, sécrétrices de défensines, situées sous les cellules souches au fond des cryptes (Ayabe et coll., 2004).

La barrière épithéliale intestinale doit assurer des rôles à priori contradictoires de perméabilité pour les nutriments et les électrolytes, et de protection contre les agents pathogènes et les substances antigéniques. Le contrôle des flux, à travers la barrière épithéliale intestinale, utilisent deux voies principales : une voie transcellulaire, qui passe par

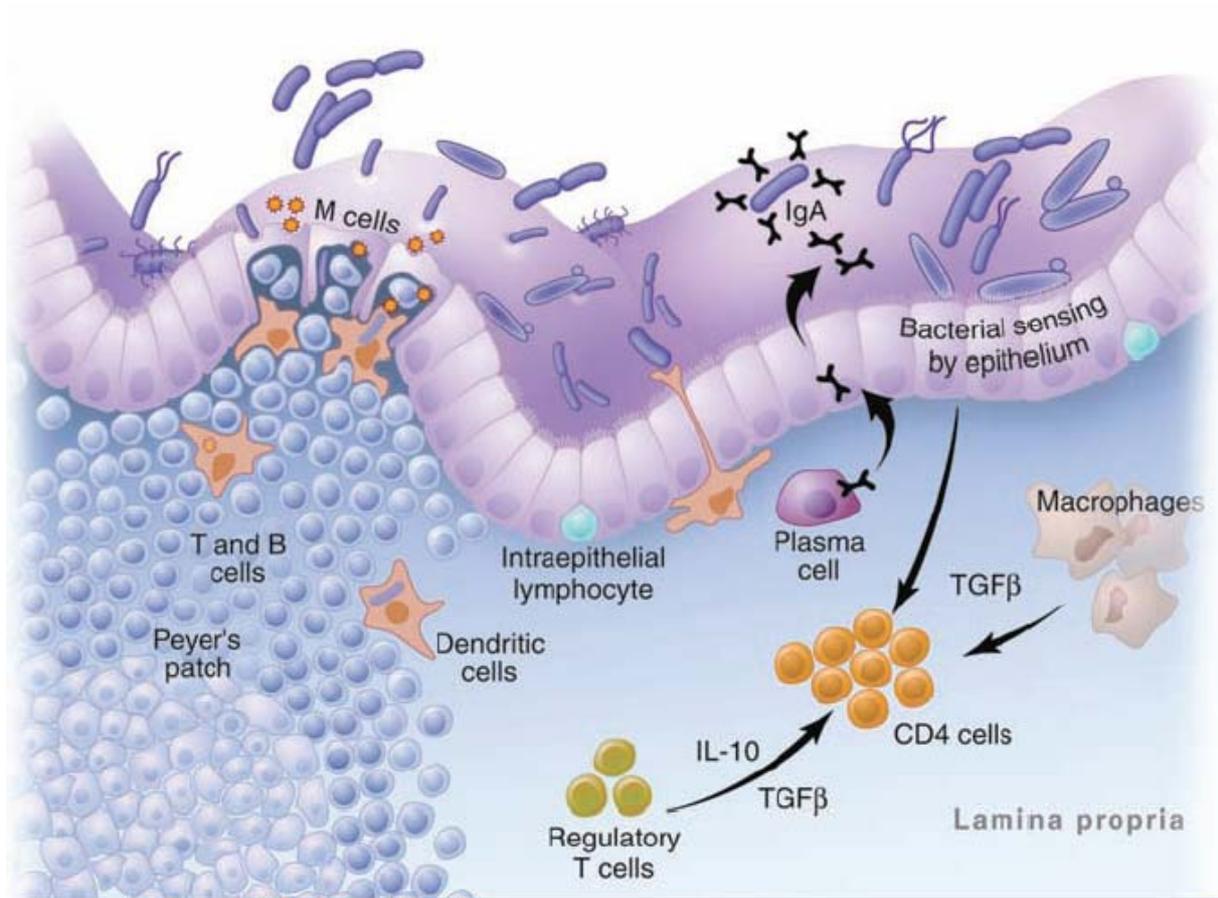


**Figure 1 : Schéma simplifié des différents compartiments d'une crypte colique. (d'après Potten, 1997)**



**Figure 2 : Rôle sensitif des cellules entérochromaffines.** La sérotonine (5-HT) sécrétée par les cellules entérochromaffines (CE, vert) active les neurones sensitifs du SNE, *via* les récepteurs 5-HT<sub>1P</sub>, et les neurones sensitifs extrinsèques, par les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>. La sérotonine est ensuite captée par les transporteurs de la sérotonine (SERT), exprimée à la surface des entérocytes. (d'après Gershon, 2003)

des pompes et des canaux spécialisés de la membrane plasmique, et une voie paracellulaire, qui est contrôlée par les jonctions serrées. D'un point de vue microscopique, les jonctions serrées apparaissent comme des contacts discrets entre les membranes plasmiques de cellules adjacentes. D'un point de vue moléculaire, ce sont des groupements de différentes protéines, incluant les protéines ZO 1, 2 et 3 (Zonula Occludens), les cingulines, les occludines et les claudines (Baumgart et Dignass, 2002). La barrière épithéliale intestinale joue également un rôle de protection contre les agents pathogènes ou les allergènes présents dans la lumière intestinale, grâce aux jonctions serrées (Madara, 1990), mais aussi grâce au manteau situé à la surface apicale des cellules épithéliales (Frey et coll., 1996) et à la sécrétion d'électrolytes et de mucines (Corfield et coll., 2000). De plus, la barrière épithéliale intestinale assure la sécrétion d'agents antibactériens, telles que les défensines (Didierlaurent et coll., 2002). Les cellules M sont également impliquées dans la protection de la barrière épithéliale intestinale. Elles sont situées au niveau de l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes disséminés tout le long du côlon, et sont responsables de la prise en charge et du transport des pathogènes situés dans la lumière intestinale (Neutra et coll., 2001) (figure 3). La barrière épithéliale intestinale est en effet soutenue par diverses cellules immunitaires, composant le tissu lymphoïde associé à l'intestin, qui assure la surveillance immunitaire de l'intestin. Il s'agit notamment des cellules dendritiques de la lamina propria, qui peuvent former des prolongements entre les cellules épithéliales intestinales. La lamina propria contient également des cellules T, CD4+ et CD8+, des macrophages et des plasmocytes produisant les IgA. (pour revue voir MacDonald et Monteleone, 2005). La muqueuse intestinale doit de plus être capable de distinguer les agents pathogènes, pour lesquels il faut déclencher une réponse immunitaire, des bactéries de la flore commensale, ne nécessitant pas une telle réponse. Des acteurs clés de cette reconnaissance sont les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Il en existe deux principales classes : les récepteurs TLR (Toll Like Receptor)



**Figure 3 : Tissu lymphoïde associé à l'intestin.** La barrière épithéliale intestinale possède des cellules spécialisées, les cellules M, qui assurent le transport des bactéries et des antigènes de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde. Les cellules dendritiques de la lamina propria peuvent traverser la barrière épithéliale intestinale et également capter des bactéries. La lamina propria contient également des cellules T et B, des macrophages et des plasmocytes. L'activation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> peut être modulée par des cellules T régulatrices qui sécrètent des cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGFβ) (MacDonald et Monteleone, 2005).

et les molécules NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain). Les TLRs, généralement associés à la membrane des cellules, ont un domaine de reconnaissance extracellulaire riche en éléments leucine répétés et un domaine intracellulaire de signalisation similaire au récepteur à l'IL-1. Les molécules NOD sont quant à elles présentes dans le cytosol des cellules épithéliales et des cellules immunitaires (MacDonald et Monteleone, 2005). Ces deux classes de PRRs sont impliquées dans les phénomènes de tolérance, qui consiste à ne pas induire de réponse immunitaire contre la flore commensale, dans l'inhibition de réactions allergiques à des antigènes d'origine alimentaire, dans la protection de fonctions de la barrière épithéliale intestinale et dans la production de facteurs antibactériens (Cario, 2005).

Au cours de processus physiopathologiques, la barrière épithéliale intestinale est le site d'altérations de la perméabilité, de la prolifération et peut déclencher une réponse inflammatoire par la sécrétion de chimiokines et de cytokines (Berkes et coll., 2003 ; Sanders, 2005). C'est notamment le cas lors de l'infection par un pathogène, tel que le *Clostridium difficile*, ou lors d'un déséquilibre du système de surveillance immunitaire, qui pourrait être à l'origine des MICI.

1.2- Les maladies inflammatoires d'origine infectieuse de l'intestin : cas de l'infection par le *Clostridium difficile*

### **1.2.1- Les colites induites par le *Clostridium difficile***

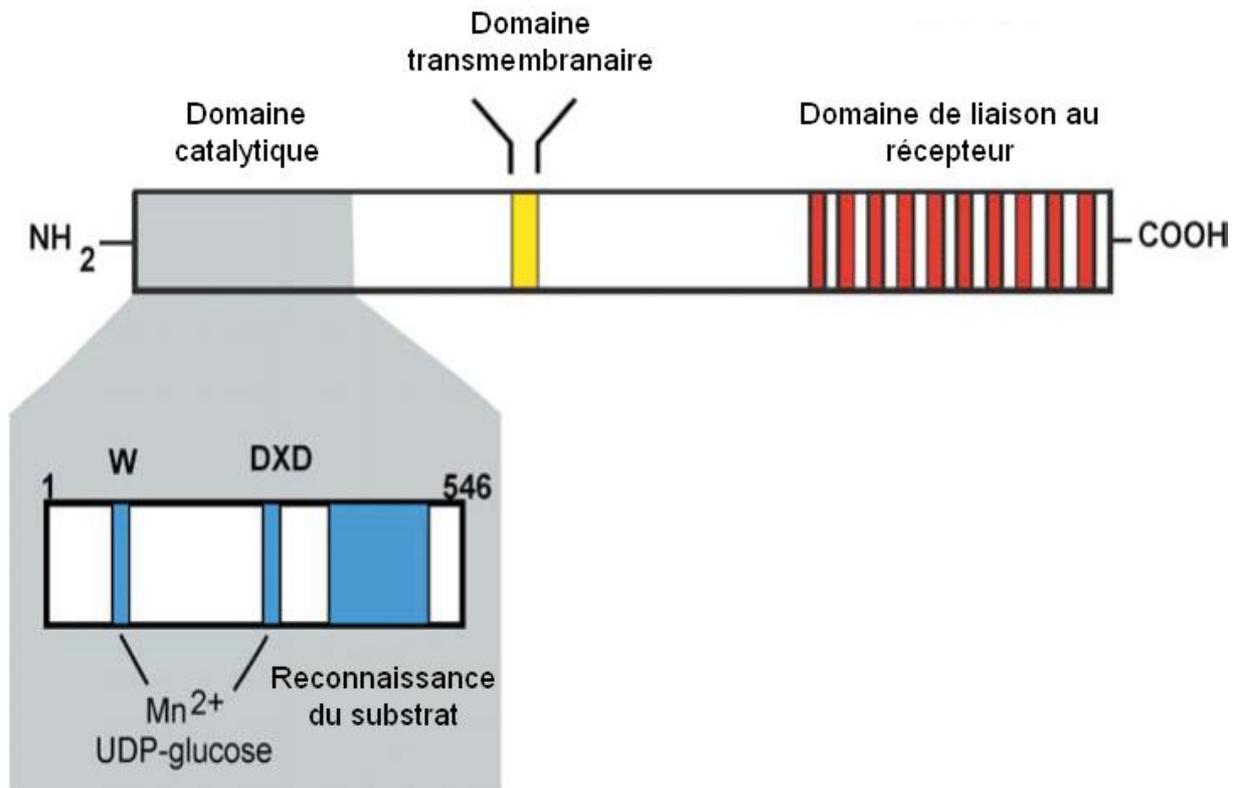
Le *Clostridium difficile* (*C. difficile*) est une bactérie pathogène toxigénique non invasive qui est la principale cause de diarrhées et de colites pseudomembraneuses associées aux antibiotiques. L'infection par le *C. difficile* affecte plusieurs millions de personnes chaque

année et est l'une des principales causes d'infections nosocomiales (Riley, 2004). Contrairement à la toxine du choléra qui cause des diarrhées sans manifestation inflammatoire, la réponse de l'organisme au *C. difficile* est caractérisée par une sécrétion de fluides, une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale s'accompagnant, dans les formes les plus sévères, d'une nécrose et d'un intense infiltrat inflammatoire composé principalement de neutrophiles (Kelly et coll., 1994 ; Savidge et coll., 2003). Le *C. difficile* sécrète deux entérotoxines protéiques, la toxine A (308 kDa) et la toxine B (270 kDa). Toutes les manifestations pathologiques générées par le *C. difficile* sont reliées à la cascade de signaux inflammatoires initiée par la fixation d'une des toxines sur un récepteur, situé sur la face apicale des entérocytes (Pothoulakis et Lamont, 2001).

### **1.2.2- Les mécanismes pathogéniques des toxines du *C. difficile***

La toxine A et la toxine B du *C. difficile* sont codées par deux gènes différents de 19,6 kb au total, situés dans la région conservée du chromosome bactérien, appelée locus de pathogénicité (Braun et coll., 1996 ; Hammond et Johnson 1995). Ces toxines ont la même structure primaire, organisée en trois domaines. La structure de la toxine B est schématisée sur la figure 4. Situé du côté C-terminal de la protéine, le domaine de liaison au récepteur est responsable de la liaison et de l'entrée de la toxine dans la cellule cible. Au milieu de la protéine se situe le domaine transmembranaire responsable de la translocation de la toxine des endosomes vers le cytoplasme. Enfin, le domaine catalytique est situé du côté N-terminal et possède une activité mono-glycosyltransférase responsable de la modification des protéines intracellulaires.

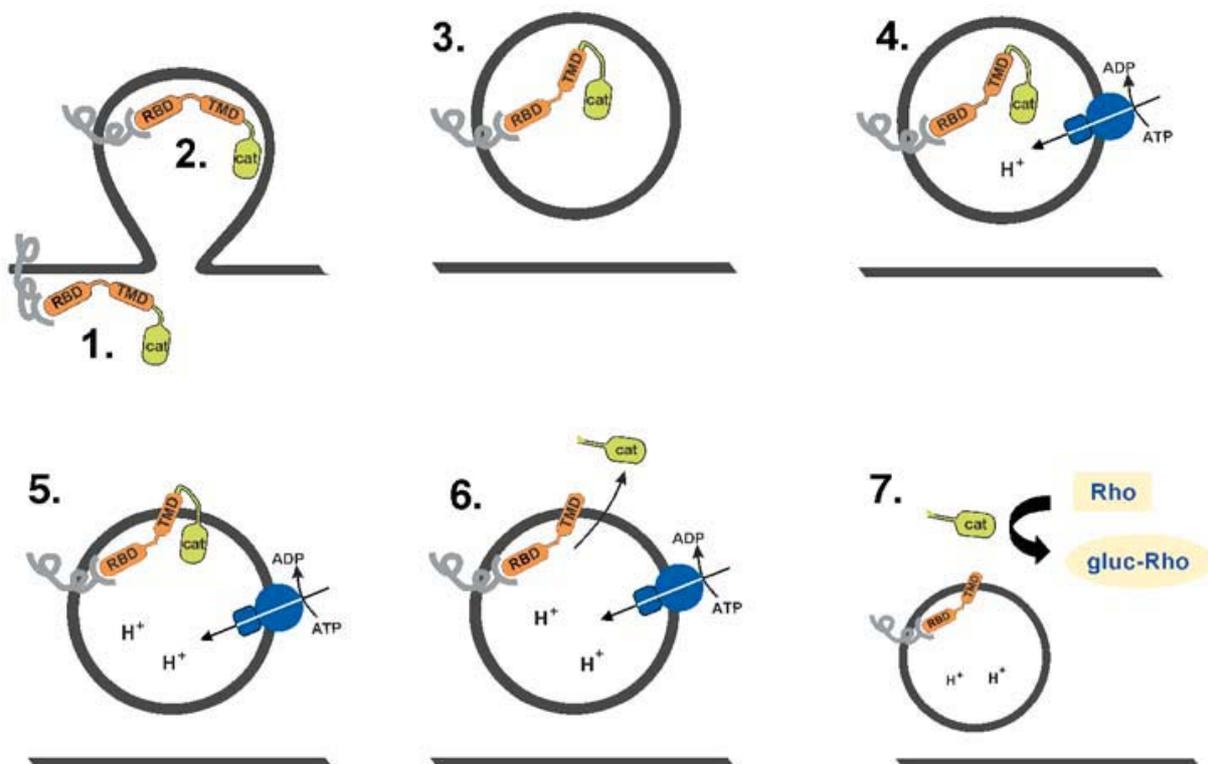
Les toxines A et B ont une activité cytotoxique intracellulaire, qui est permise par leur internalisation dans la cellule cible. Les mécanismes impliqués dans l'internalisation des



**Figure 4 : Structure de la toxine B du *C. difficile*.** La toxine B est organisée en trois domaines fonctionnels. Le domaine de liaison au récepteur est composé d'éléments oligopeptidiques répétés qui se fixent sur des éléments de liaison glucidiques à la surface de la cellule cible et permet l'endocytose de la toxine. La région hydrophobe de la toxine est impliquée dans la formation potentielle d'un domaine transmembranaire permettant de former un pore ou un canal, qui permet la translocation du domaine catalytique dans le cytoplasme de la cellule. Le domaine catalytique est responsable de l'activité monoglucosyltransférase qui modifie l'activité des Rho-GTPases. (Just et Gerhard, 2004).

toxines ne sont pas connus en détail. Cependant, un modèle d'entrée des toxines du *C. difficile* dans la cellule cible, a récemment été proposé par Just et Gerhard (2004). Celui-ci s'articule en 7 étapes (figure 5) : (1) liaison de la toxine sur un récepteur, (2) induction de l'endocytose du complexe toxine-récepteur (3) formation des endosomes à partir des vésicules endocytosées, (4) acidification des endosomes par l'action des pompes à protons ATPases, (5) repliement de la toxine, en particulier du domaine hydrophobe transmembranaire qui interagit avec la membrane de l'endosome pour former un pore, (6) translocation du domaine catalytique de la toxine, libéré, par clivage protéolytique, vers le cytoplasme de la cellule cible et (7) monoglycosylation par le domaine catalytique des cibles Rho-GTPases du cytoplasme. Cependant, les différentes étapes de ce modèle, n'ont pas été mises en évidence pour les deux toxines du *C. difficile*. En effet, la liaison au récepteur membranaire de la cellule cible n'est connue que pour la toxine A et le rôle de l'acidification de l'endosome et la libération du domaine catalytique ne sont connus que pour la toxine B (Just et Gerhard, 2004).

La fixation de la toxine A sur son récepteur semble faire intervenir des structures glycosidiques ou des glycoprotéines présentes à la surface de la membrane plasmique de la cellule cible (Just et Gerhrad, 2004). La structure Gala1-3Galb1-4GlcNAc a tout d'abord été identifiée chez les animaux (Krivan et coll., 1986 ; Tucker et Wilkins 1991), mais celle-ci est absente chez l'homme, qui ne possède pas l'enzyme  $\alpha$ -galactosyltransférase nécessaire à l'assemblage du trisaccharide (Larsen et coll., 1990). Depuis d'autres études ont montré que la toxine A peut également se lier à la structure GalNAcb1-3Galb1-4GlcNAc, qui elle est présente chez l'homme (Karlsson, 1995 ; Teneberg et coll., 1996). La glycoprotéine sucrase-isomaltase a également été identifiée pour être un récepteur fonctionnel de la toxine A de la barrière en brosse iléale du lapin (Pothoulakis et coll., 1996). Cependant, ce récepteur est absent dans le côlon humain, où d'autres récepteurs de structures identiques seraient impliqués.



**Figure 5. Entrée de la toxine A ou de la toxine B du *C. difficile* dans la cellule cible.** RDB : domaine de liaison au récepteur ; TMD : domaine transmembranaire ; cat : domaine catalytique (Just et Gerhard, 2004).

L'activité cytotoxique des toxines du *C. difficile* réside dans l'activité enzymatique du domaine catalytique. Cette enzyme catalyse le transfert d'un résidu glucose à partir d'un UDP-glucose vers les petites protéines G intracellulaires, telles que RhoA, Rac, Cdc42, RhoG et TC10 (Boquet et Lemichez, 2003 ; Just et coll., 1995a, b). Cette glycosylation entraîne en particulier l'inactivation des protéines Rho, qui sont d'importants régulateurs de nombreuses fonctions cellulaires, comme la formation de fibres de stress, le contact cellule/cellule, la régulation des jonctions serrées, et le trafic membranaire (pour revue voir Hall, 1998). L'altération des fonctions des protéines Rho par les toxines du *C. difficile* conduit à une désagrégation des fibres d'actine, une perte d'adhésion et l'arrondissement des cellules, conduisant à la mort de ces dernières.

Néanmoins, la signalisation Rho-dépendante n'est pas la seule cible intracellulaire des toxines du *C. difficile*. Des données récentes ont montré que la toxine A du *C. difficile* active les voies MAP kinases p38, ERK1/2 et JNK dans la lignée de monocytes THP-1 conduisant à la sécrétion de médiateurs inflammatoires, bien avant que l'internalisation de la toxine et la glycosylation de Rho n'aient eu lieu, suggérant que les effets de la toxine A sur l'activation des monocytes THP-1 est Rho-indépendante (Warny et coll., 2000). Par ailleurs, des résultats obtenus avec la lignée HT-29, ont démontré que la toxine A du *C. difficile* provoque également des altérations des mitochondries conduisant à une diminution de la production d'ATP et à la formation de radicaux oxygénés, indépendamment de Rho (He et coll., 2002).

### **1.2.3- Altérations de la barrière épithéliale intestinale et inflammation induites par les toxines du *C. difficile***

Lors de l'infection par le *C. difficile*, la barrière épithéliale intestinale est la première cible des toxines. Des études ont montré que les toxines A et B altèrent les fonctions de la

barrière épithéliale intestinale, telles que la perméabilité, en ouvrant les jonctions serrées (Gerhard et coll., 1998 ; Hecht et coll., 1988, 1992 ; Triadafilopoulos et coll., 1987, 1989 ; Riegler et coll., 1995). De plus, la toxine B induit davantage de dommages que la toxine A pour des concentrations identiques (Riegler et coll., 1995 ; Flegel et coll., 1991). Ces effets sont en partie dus à l'inactivation des protéines Rho, qui régulent le complexe des jonctions serrées (Nusrat et coll., 1995). Les toxines du *C. difficile* ont également été impliquées dans le détachement et l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales (Brito et coll., 2002 ; Fiorentini et coll., 1998 ; Mahida et coll., 1996). Par ailleurs, des études ont montré que les toxines du *C. difficile* induisent la nécrose des monocytes humains (Flegel et coll., 1991 ; Warny et coll., 1999, 2000).

L'infection par le *C. difficile* induit également une importante réponse inflammatoire, caractérisée par la sécrétion de cytokines. Chez l'homme, une augmentation de la concentration d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8 a été rapportée chez des patients atteints de colites sévères induites par le *C. difficile* (Steiner et coll., 1997). Une étude, basée sur l'utilisation de tissu humain, a également montré que la toxine B du *C. difficile* induit l'expression des ARNm et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par la muqueuse et la sous-muqueuse (Neunlist et coll., 2003b). Dans un modèle intégré de xénotransgreffe de côlon humain chez des souris immunodéficientes, Savidge et coll. (2003) ont quant à eux rapporté une augmentation de la synthèse de l'IL-8, notamment dans les cellules épithéliales intestinales, en réponse à la toxine A ou à la toxine B du *C. difficile*. Par ailleurs, les effets des toxines du *C. difficile* sur l'induction de la sécrétion de cytokines ont été surtout étudiés dans des modèles cellulaires. Différentes études ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  par les monocytes primaires humains ou la lignée de monocytes THP-1 en réponse à la toxine A et à la toxine B du *C. difficile* (Flegel et coll., 1991 ; Linevsky et coll., 1997 ; Warny et coll., 1999). Linevsky et coll. (1997) ont en particulier obtenu un maximum d'induction de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  avec

respectivement  $10^{-9}$  M et  $10^{-10}$  M de toxine A dans des monocytes primaires humains. Les toxines du *C. difficile* induisent également la sécrétion d'IL-8 par les monocytes primaires ou THP-1 (Linevsky et coll., 1997 ; Warny et coll., 2000 ; Jefferson et coll., 1999). Linevsky et coll. (1997) ont en particulier montré que la toxine A, à  $10^{-10}$  M, et la toxine B, à  $10^{-12}$  M, augmentent la sécrétion basale des monocytes humains primaires respectivement de 100 et 20 fois. Ces deux toxines augmentent également la libération d'IL-8 par les macrophages THP-1 différenciés. L'implication des cellules épithéliales intestinales dans la sécrétion d'IL-8 au cours de l'infection par le *C. difficile* est également décrite par quelques études *in vitro*. Diverses études ont en effet montré que la production d'IL-8 en réponse à la toxine A est augmentée dans des colonocytes humains primaires et dans des lignées coliques humaines, telles que T84, HT-29, HT-29 clone 16E et Caco-2 (Mahida et coll., 1996 ; Kim et coll., 2002 ; Johal et coll., 2004 ; Branka et coll., 1997 ; He et coll., 2002).

Ces cytokines, sécrétées au cours de l'inflammation causée par l'une ou l'autre des toxines du *C. difficile*, sont responsables de la génération de l'infiltrat inflammatoire associé à cette infection. Rocha et coll. (1997) ont en particulier montré que la formation d'un influx de neutrophiles, induite par la toxine A dans la cavité péritonéale chez le rat, est bloquée par des anticorps bloquant l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ . De même, Castagliuolo et coll. (1998a) ont montré que l'inflammation induite par la toxine A chez le rat est réduite après l'administration d'un anticorps neutralisant anti-MIP-2, qui est une chimiokine analogue à l'IL-8. Le rôle majeur joué par l'IFN $\gamma$  au cours de l'infection par la toxine A du *C. difficile* a également été montré par Ishida et coll. (2004). Ils ont utilisé un modèle de souris invalidées pour l'IFN $\gamma$  et montré que l'inflammation et l'altération de la barrière épithéliale induite par la toxine A chez les souris sauvages sont absentes chez les souris IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Le prétraitement des animaux avec un anticorps neutralisant anti-IFN $\gamma$  conduit au même effet.

Par ailleurs, les toxines du *C. difficile* ciblent également le système nerveux, ce qui conduit à l'amplification de l'inflammation et à la diarrhée sécrétoire. Les mécanismes impliqués dans l'activation de ces voies nerveuses au cours de l'infection par le *C. difficile* seront développés dans le paragraphe consacré aux rôles du SNE au cours de l'inflammation intestinale (paragraphe 3.1.1).

### **1.3- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)**

#### **1.3.1- Caractéristiques générales**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) affectent une part croissante de la population occidentale. Il en existe deux grands types : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les principales caractéristiques de ces deux maladies sont regroupées dans le tableau 1. D'une manière générale, les patients atteints d'une MICI souffrent de diarrhée chronique, d'une perte de poids, de douleurs abdominales, de fièvre et de fatigue. Ces maladies évoluent en poussées entrecoupées de périodes de rémission de durée variable.

Ces deux maladies sont caractérisées par des ulcérations de la muqueuse et l'afflux de cellules immunitaires. Ces manifestations, pour la rectocolite hémorragique, sont limitées au côlon et l'infiltrat inflammatoire associé ne pénètre pas plus loin que la muqueuse et la lamina propria dans la plupart des cas. En revanche, la maladie de Crohn peut toucher toutes les parties du tube digestif et atteindre toute l'épaisseur de la paroi digestive, allant jusqu'à la formation de profondes fissures ou fistules.

**Tableau 1 : Caractéristiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.**  
(d'après MacDonald et Monteleone, 2005).

Caractéristiques	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
Incidence	En constante augmentation	Incidence stable
Distribution	Maladie de sociétés occidentales, plutôt urbaines, avec l'incidence la plus forte en Europe du nord	Indifférentes
Causes	Probablement une réponse immunitaire cellulaire excessive en réponse à des antigènes ou des bactéries de la flore commensale	Inconnues, mais peut être une maladie autoimmune organe-spécifique
Lieu de la maladie	Touche n'importe quelle partie du tube digestif, mais affecte la plupart du temps l'iléon et le côlon. Lésions non continues	Touche le côlon. Lésions continues
Réponse inflammatoire	Médiée principalement par les cellules T et les macrophages. Affecte toute la paroi digestive et forme des ulcères profonds qui peuvent conduire à des fistules. Fibrose du muscle possible. Plutôt de type Th1	Infiltration de neutrophiles. Inflammation limitée à la muqueuse, formant des abcès au niveau des cryptes. Perte des cellules de Goblet sécrétant le mucus. Plutôt de type Th2
Autres	Fumer est un facteur de risque	Fumer semble protéger contre le développement de la maladie. L'appendicectomie a le même effet
Traitement médical	Corticostéroïdes. Azathioprine. Anticorps anti-TNF $\alpha$	Corticostéroïdes. Azathioprine. Aminosalicylates

### 1.3.2- Etiologie des MICI

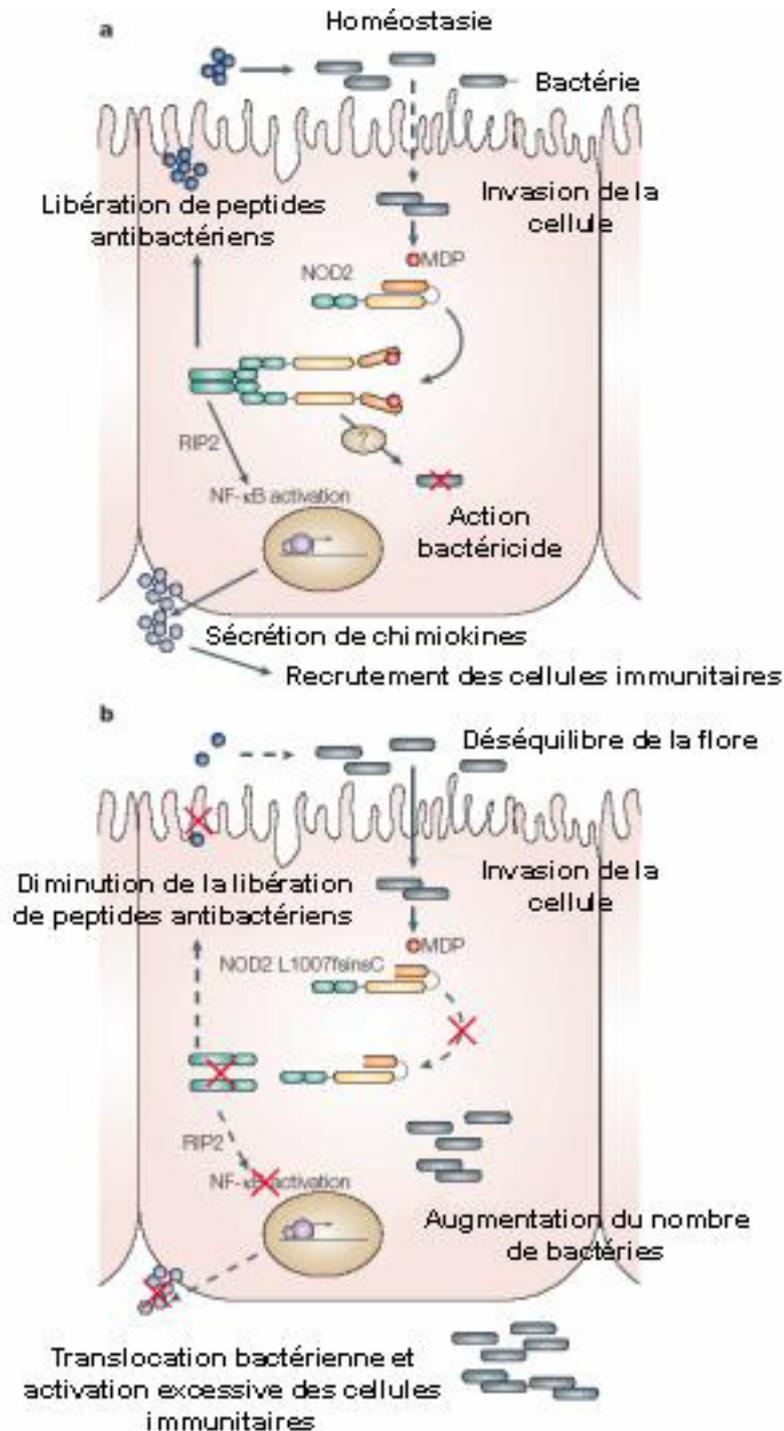
L'étiologie de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique est encore largement inconnue. Néanmoins, il semble de plus en plus évident que ces maladies n'ont pas une cause unique, mais que l'accumulation de différents facteurs conduit au développement des MICI. En particulier, des facteurs génétiques, de multiples facteurs environnementaux et des dysfonctionnements du système immunitaire semblent être impliqués (Fiocchi, 1998).

#### *1.3.2.1- Facteurs génétiques*

Le polymorphisme génétique de différents gènes a été impliqué dans les MICI. Les gènes concernés sont nombreux. Il s'agit par exemple des gènes codant pour le TNF $\alpha$ , l'IL-1ra (IL-1receptor antagonist) ou les ICAM (intercellular adhesion molecule) (Fiocchi, 1998). Le polymorphisme génétique qui a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années concerne le gène CARD15 (Caspase Recruitment Domain-containing protein) codant pour la protéine NOD2. En effet, des mutations de ce gène ont été reconnues pour jouer un rôle dans la maladie de Crohn (Cavanaugh et coll., 2003 ; Croucher et coll., 2003 ; Helio et coll., 2003 ; Lesage et coll., 2002 ; Roussomoustakaki et coll., 2003). En particulier, Hugot et coll. (2001) ont montré qu'une mutation de CARD15 augmente le risque de développer la maladie de Crohn de 3 fois pour les homozygotes et de 38 fois pour les hétérozygotes. Deux mutations de ce gène augmentent ce risque de 44 fois. Cependant, de telles mutations ne semblent pas être impliquées dans l'étiologie de la maladie de Crohn dans les pays asiatiques (Sugimura et coll., 2003 ; Leong et coll., 2003). De plus, les porteurs d'une mutation de CARD15/NOD2 ne présentent pas forcément des signes cliniques de la maladie de Crohn (Linde et coll., 2003), suggérant la contribution de facteurs environnementaux dans l'étiologie de cette maladie. Les

bactéries joueraient en particulier un rôle important dans l'initiation de la maladie (Cario, 2005). NOD2 est en effet une molécule impliquée dans la reconnaissance des bactéries présentes dans la lumière intestinale. Le ligand de NOD2 est le muranyl dipeptide, un constituant de la paroi bactérienne dérivant des peptidoglycanes, non reconnu par les récepteurs TLR (Inohara et Nunez, 2003 ; Girardin et coll., 2003). Par ailleurs, l'expression de CARD15 est augmentée dans les cellules de Paneth et les macrophages au cours de la maladie de Crohn (Berrebi et coll., 2003). Dans les macrophages, des altérations du fonctionnement de NOD2 seraient responsables d'une infection bactérienne persistante des macrophages conduisant au recrutement chronique excessif des cellules T au cours des MICI (Bouma et Strober, 2003). Les cellules de Paneth se situent au niveau de l'iléon terminal, zone du tube digestif où se déclare le plus souvent la maladie de Crohn (MacDonald et Monteleone, 2005). Une mutation de CARD15 induirait une perte de fonction de NOD2 dans les cellules de Paneth, ce qui conduirait à un défaut de la sécrétion de défensines et à l'invasion des bactéries (Rogler, 2004). La figure 6 présente la signalisation normale de NOD dans les cellules épithéliales intestinales et les conséquences potentielles d'un dysfonctionnement de NOD2 du à une mutation du gène.

Par ailleurs, la coexistence de mutations des deux gènes codant respectivement pour TLR4 et NOD2 a été corrélée avec une augmentation de la susceptibilité de développer une MICI dans une population grecque (Gazouli et coll., 2004). Des mutations du gène codant pour TLR4 semblent en effet également être impliquées dans les MICI. En particulier, un polymorphisme génétique du gène codant pour TLR4 a été associé à la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique dans une population belge (Franchimont et coll., 2004). Cette association n'a cependant pas été trouvée dans des populations écossaises (Arnott et coll., 2004) ou allemandes (Torok et coll., 2004).



**Figure 6 : Fonction de NOD2 dans les cellules de Paneth.** **a-** La reconnaissance intracellulaire du muranyl dipeptide (MDP) de la bactérie par le domaine riche en leucines de NOD2 conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B médiée par RIP2 (Receptor Interaction Protein). NOD2 aurait alors un rôle bactéricide. La sécrétion contrôlée de chimiokines et de défensines contribue à l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. **b-** La maladie de Crohn est associée à des mutations de NOD2 qui en conséquence augmentent la réaction de l'épithélium aux bactéries de la flore commensale. (Schreiber et coll., 2005)

De plus, les souris déficientes pour le gène de TLR4 ou présentant une mutation de ce gène développent plus facilement une colite suite au traitement par le DSS (Dextran Sodium Sulfate) que les souris sauvages (Rakoff-Nahoum et coll., 2004 ; Elson, 1995). De plus, des mutations de TLR4, diminuant la sensibilité des souris au LPS, les prédisposent aux infections par des bactéries Gram négatives, telles que *Salmonella typhimurium* (O'Brien, 1980).

#### 1.3.2.2- Facteurs environnementaux

Parmi les facteurs environnementaux impliqués dans le développement des MICI, les bactéries présentes dans la lumière du tube digestif semblent jouer un rôle majeur. En effet, chez l'homme, les traitements antibiotiques améliorent l'état des patients présentant une MICI (Wehkamp et coll., 2005). De plus, l'éradication de la flore commensale, dans la plupart des modèles animaux, conduit à une réduction, voire à une absence d'inflammation (Sartor, 2004). Par ailleurs, de nombreuses bactéries ont été associées à l'initiation et/ou la persistance des lésions au cours des MICI. Il s'agit par exemple de *Mycobacterium paratuberculosis* (Sanderson et coll., 1992) ou d'une souche d'*Escherichia coli* dotée de propriétés particulières d'adhésion et d'invasion (Darfeuille-Michaud et coll., 1998). Cependant, les bactéries capables d'induire une inflammation sont différentes selon les modèles animaux, ce qui complique l'identification des bactéries commensales capables d'induire une MICI. Par ailleurs, d'autres espèces bactériennes semblent avoir des effets bénéfiques sur les MICI. Ces bactéries, également appelées probiotiques, sont capables de réduire les symptômes inflammatoires liés aux MICI (Sartor, 2005). Le tableau 2 présente des exemples d'espèces bactériennes ayant des effets bénéfiques ou délétères sur l'inflammation intestinale.

**Tableau 2. Espèces bactériennes de la flore commensale entérique protectrices ou agressives.** (D'après Sartor, 2005)

Bactéries bénéfiques	Bactéries délétères
Espèces de <i>Lactobacillus</i> Espèces de <i>Bifidobactéries</i> <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Espèces de <i>Bactéroïdes</i> <i>Enterococcus faecalis</i> Souches d' <i>Escherichia coli</i> adhérentes et invasives Espèces d' <i>Eubacterium</i> et de <i>Peptostreptococcus</i> <i>Fusobacterium varium</i> Espèces d' <i>Helicobacter</i> intestinales

Des agents infectieux viraux ont également été incriminés dans la susceptibilité de développer une MICI (Danese et coll., 2004). Ainsi, une étude a montré que le virus de la rougeole, chez la femme enceinte, augmenterait le risque de développer la maladie de Crohn par le nouveau-né (Wakefield et Pounder, 1995).

Parmi les autres facteurs environnementaux figure également le tabac, qui semble être bénéfique pour la rectocolite hémorragique mais délétère pour la maladie de Crohn (Fiocchi, 1998). Une hygiène importante lors de la petite enfance serait aussi un facteur de risque pour la maladie de Crohn (Gent et coll., 1994).

Enfin, l'état psychologique, tel que le stress, l'anxiété ou la dépression, semble également être impliqué dans le développement des MICI. Toutefois, les données obtenues chez l'homme ou grâce aux modèles animaux suggèrent que ces facteurs psychologiques ne seraient pas une des causes des MICI, mais qu'ils seraient plutôt des facteurs aggravants les manifestations de la maladie (Danese et coll., 2004). Ainsi, une étude a montré que la dépression et l'anxiété favorisent le déclenchement d'une poussée de la maladie (Mittermaier et coll., 2004).

### 1.3.3- Caractéristiques générales de la réponse inflammatoire au cours des MICI

La maladie de Crohn est caractérisée par une réponse exagérée des lymphocytes CD4+ « helper » qui produisent un profil cytokinique de type Th1, dont l'IFN $\gamma$ , l'IL-12 et/ou le TNF $\alpha$  en sont des représentants clés (Bouma et Strober, 2003). La rectocolite hémorragique est quant à elle caractérisée par une réponse immunitaire de type Th2, associée à une forte production d'IL-13, d'IL-4 et d'IL-5 (Bouma et Strober, 2003).

Le développement des MICI est associé à une dérégulation du système immunitaire. Une étude a en effet montré que des cellules T, provenant de patients atteints de la maladie de Crohn en poussée, prolifèrent et sécrètent des cytokines (IL-12, IFN $\gamma$  et IL-10) en réponse à des antigènes de leur microflore tandis que les cellules T de patients sains ne le font pas (Duchmann et coll., 1995). Une hypothèse serait que la maladie résulte d'une sollicitation excessive des cellules T effectrices, qui sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires, ou d'un investissement déficient des cellules régulatrices, qui sécrètent des facteurs immunosuppresseurs. En particulier des études ont montré le rôle crucial joué par les cellules T régulatrices, CD4+/CD25+, dans la suppression de l'inflammation *via* le TGF- $\beta$  (Bouma et Strober, 2003). Les cellules dendritiques joueraient également un rôle dans le développement des MICI. Une étude a en effet montré que leur nombre est augmenté dans la muqueuse de patients atteints de la maladie de Crohn (De Baey et coll., 2003). Dans des modèles murins de colite, une étude a de plus montré que le nombre de cellules dendritiques est augmenté et que l'expression des molécules CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et de molécules costimulatrices des cellules T est augmentée (Krajina et coll., 2003).

Une dérégulation des effecteurs du système immunitaire provoque la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. De nombreuses études ont en effet montré que les MICI sont

associées à une augmentation de la production en cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-6 (Schreiber et coll., 1999 ; Mahida et coll., 1989 ; Olson et coll., 1993 ; Woywodt et coll., 1994 ; Reinecker et coll., 1993 ; Stevens et coll., 1992 ; Braegger et coll., 1992 ; Mahida et coll., 1991 ; Youngman et coll., 1993 ; Arai et coll., 1998a ; Arai et coll., 1998b).

Les cellules mononuclées de la lamina propria ont été reconnues comme étant la source majeure d'IL-1 $\beta$  au cours des MICI (Mahida et coll., 1989 ; Olson et coll., 1993 ; Woywodt et coll., 1994 ; Youngman et coll., 1993 ; Reinecker et coll., 1993). L'expression d'IL-1 $\beta$  a également été détectée dans les lymphocytes intraépithéliaux (Lundqvist et coll., 1996) et dans les cellules épithéliales intestinales au cours des MICI (Woywodt et coll., 1994). Par ailleurs, une induction de la sécrétion d'IL- $\beta$  a également été démontrée dans les pouchites (Gionchetti et coll., 1994) et dans les formes sévères du syndrome de l'intestin irritable post infectieux (Gwee et coll., 2003). L'effet pro-inflammatoire de l'IL-1 $\beta$  est bloqué par l'antagoniste à son récepteur, l'IL-1ra. En particulier, dans un modèle de rat DSS, Thomas et coll. (1991) ont montré que l'IL-1ra diminue l'accumulation des neutrophiles dans la muqueuse colique et la nécrose. Dans un modèle de colite induite à la formaline chez le lapin, l'IL-1ra bloque les manifestations inflammatoires et notamment la production de prostaglandines et de leucotriènes (Cominelli et coll., 1992). Ferretti et coll., (1994) ont montré quant à eux que l'administration d'anticorps bloquant anti-IL-1ra aggrave les manifestations inflammatoires dans ce modèle de colite chez le lapin. Chez l'homme, une diminution du ratio IL-1ra / IL-1 $\beta$  a été rapportée dans les régions inflammatoires de la muqueuse (Nishiyama et coll., 1994). La réduction de ce ratio est de plus corrélée avec le degré de sévérité de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique (Casini-Raggi et coll., 1995). La source principale d'IL-1ra serait les macrophages de la lamina propria (Nishiyama et coll., 1994).

Plusieurs études ont de plus observé au cours des MICI une augmentation de la concentration en chimiokines dans l'intestin, telles que l'IL-8 et MCP-1 (MacDermott, 1999). La production locale de chimiokines entraîne le recrutement de cellules immunitaires à partir du sang vers le site de l'inflammation, ce qui augmente la libération de cytokines, de radicaux libres et de médiateurs lipidiques, contribuant à l'altération des tissus au cours des maladies inflammatoires intestinales (Fiocchi, 1998). Le rôle clé joué par les chimiokines au cours de l'inflammation intestinale, d'origine chronique ou infectieuse, est développé dans le paragraphe suivant.

#### **1.4- La production de chimiokines au cours de l'inflammation intestinale**

Au cours de l'agression par un pathogène, l'intestin met en place une réponse inflammatoire qui vise à détruire ce pathogène. Cette réponse passe par le recrutement de cellules immunitaires par les chimiokines. De plus, suite à l'agression par le pathogène, des mécanismes de réparation des tissus sont mis en jeu, dans lesquels les chimiokines joueraient également un rôle important.

##### **1.4.1- La famille des chimiokines**

Les chimiokines sont des cytokines à pouvoir chimiotactique. Ce sont de petites protéines de 7 à 12 kDa responsables du recrutement et de l'activation des leukocytes au niveau des sites endommagés. Elles se répartissent en quatre groupes selon la disposition des résidus cystéine conservés : CXC, CC, CX<sub>3</sub>C et C. La conservation des résidus cystéine est illustrée par un alignement de séquences des chimiokines sur la figure 7.

Groupe CXC

IL-8	SAKELRC	-Q	CIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCA	ANTEIIVKLSD	--GREI	CLDPKENVVQRVVEKFLKRAENS
GRO $\alpha$	ASVATELRC	-Q	CLQT-LQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCA	QTEVIATLKN	--GRKACLNP	ASPIVKKIIEKHLNSDKSN
GRO $\beta$	APLATELRC	-Q	CLQT-LQGIHLKNIQSVKVPSPGPHCA	QTEVIATLKN	--GQKACLNP	ASPHVKKIIEKHLKNGKSN
GRO $\gamma$	ASVVTELRC	-Q	CLQT-LQGIHLKNIQSVNVKSPGPHCA	QTEVIATLKN	--GKKACLNP	ASPHVQKIIIEKHLNKGSTN
NAP-2	AELRC	-H	CIKT-TSGIHPKNIQSLVIGKGTHC	NQVEVIATLKD	--GRKICLDP	DAPRIKKIVQKLAGDESAD
ENA-78	AGPAAAVLRELRC	-V	CLQT-TQGVHPKMI SNLQVFAIGPQC	SKVEVVASLKN	--GKEICLDP	EAPFLKKVIQKILDGGNKEN
GCP-2	GPVSAVLELRC	-T	CLRV-TLRVNPKTIGLQVFPAGQPC	SKVEVVASLKN	--GKQVCLDP	EAPFLKKVIQKILDSGNK
PF4	EAEEDGLQC	-L	CVKT-TSQVVRPREITSLEVIKAGPHCP	TAQLIATLKN	--GRKICLDP	QAPLYKKIIEKHLLES
IP-10	VPLSRTVRC	-T	CISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQPC	PRVEIATMCKK	--GEKRCCLNP	ESKAIKMLLKAVSKEMSKRSP
Mig	TPVVRKGRC	-S	CISTNGGTIHLGSLKDLKQFAPSPSC	EKIEIATLKN	--GVGTCLNP	SADVVELIKKWEKPVSQKKKQ
PBS/SDF-1	KPVSLSYRC	-P	C-RFFESHVARANVKHLKILM-TPNCA	-LQIVARLKN	-NRQV	QIDPKLKIQETLEKALNK

Groupe CC

MCAF/MCP-1	QFDAINAPVTC	---	CYNFTNRKISVQRLASY-RRITSSR	CPKEAVIFK	--TIVAKEIC	ADPKQVWQDSHDELDKQTQTPKT
MCP-2	QPDSYSIPITC	---	CFNVIINRKIPIQRLASY-TRITNIQ	CPKEAVIFK	--TKRGEVCA	ADPKERWVRDSHMKELDQIFQNLKP
MCP-3	QPVGINTSTTC	---	CYRFINKKIPKQRLASY-RRITSSR	CPKEAVIFK	--TKLDKEIC	ADPTQKVVQDFMKELDKKTQTPKL
MCP-4	QPDALNVPTC	---	CFTFSSKKISLQRLKSY-VITTSR	CPKEAVIFR	--TKLGKEIC	ADPKKVVQNYMKHLGRKAHTLKT
Eotaxin	GP-A-SVPTTC	---	CFNLANRKIPQRLASY-RRITSSR	CPKEAVIFK	--TKLAKDIC	ADPKKVVQDSMKYLDQKSPPTPKP
RANTES	SPYS SDT-TPC	---	CFAYIARPLPRAEIKKEY-FY-TSGR	CSNPAVVFV	--TRKNRQVC	ANPEKVVREYINSLKNS
MIP-1 $\alpha$	ASLAADTPTAC	---	CFSYTSRQIPQNF IADY--FETSSQ	CSKPGVIFL	--TKRSRQVC	ADPSEEVVQKYVSDLELSA
MIP-1 $\beta$	APNGSDPPTAC	---	CFSYTARKLPRNFVVDY--YETSSQ	CSQPAVVFQ	--TKRSKQVC	ADPSESVVQYVYDLELN
HCC-1	SRGPHYHSEC	---	CFYTTTYKIPRQRIMDY--YETNSQ	CSKPGVIFI	--TKRGHSVC	TNPSDKVVQDYIKDMKEN
MIP-3 $\alpha$ /LARC	ASN-FDC	---	CLGYTDRILHPKFIYGFTRQLANEG	CDINA IIFH	--TKKLSVC	ANPKQTVVKYIVRLSKVKDM
MIP-3 $\beta$ /ELC	GTND AEDC	---	CLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDG	CRVPAVVFV	--TLRGRQLC	APPDQVVERI IQRLQRTSAKMKRRSS
I-309	KSMQVFP SR-C	---	CFSFAEQEIPLRAILCY--RNTSSQ	CSNEGLIFKL	--KRGKEACALD	TVGVVQREKMLRHCPSEK
TARC	AR-GTNVGR	---	CLEFFKGAIPLRKLTW--YQTSSE	CSRDAIVFV	--TVQGRAICS	DPNNKRVKNAVYKQLSERS
MIPF-1	...ATSADC	---	CISYTPRSIPCSLLESY--FETNSQ	CSKPGVIFL	--TKKGRPFCA	NPSDKQVQVCMRHLKSTRIKTRKN
MIPF-2/Eotaxin-2	VVIPSPC	---	CHFFVSKRIPENRVVSY-QLSSRST	CLKGGVIFT	--TKGQDFC	GDPKQEVQRYMKHLDAKQKASPRARAV
MDC	GPYGANMDSVC	---	CRDYVRYRLP-LRVVYKH-FYWTSDS	CPRPVGVLL	--TFRDEIC	ADPRVFWVKHILNKLKSLQ
DC-CK1/PARC	QVGTNKELC	---	CLVYTSWQIPQKFIYDY--SETSPQ	CPKLGVILL	--TKRGRQIC	ADPNKVVQKYISDLKLNA
SLC16C/kine	SDGGAQDC	---	CLKYSQRKIPAKVYR SYRQEP	SLGCSIPA	ILFLP	PKRSQAELCADPKELVVQQLHQHLDKTPSQKPKQ...

Groupe C

lymphotactin	GSEVSDKRT	---	CVSLTQRLPVSRIKTY-T-IT-EG-SLRAVIFI	--TKRGLKVC	ADPQATVVRDVRSHDRKSNTR
--------------	-----------	-----	-----------------------------------	------------	-----------------------

Groupe CX<sub>3</sub>C

fractalkine	QHHGVTK	CNITCSKNTS-KIPV-ALLIH--YQQNAS	CGKRAIILE--TRQHLF	CADPKEQVYXKDAHQHLDRQAAALTRNG...
-------------	---------	-------------------------------	-------------------	---------------------------------

Figure 7 : Alignement des séquences peptidiques des quatre groupes de la famille des chimiokines. Les résidus cystéines conservés sont encadrés. (Mukaida et coll., 1998)

Le groupe CXC réunit les chimiokines dont les deux résidus cystéine, situés dans la partie N-terminale de la protéine, sont séparés par un acide aminé. Dans ce groupe, sont distingués deux sous-groupes, ELR (+) et ELR (-), présentés dans le tableau 3, selon la présence ou non d'un motif ELR (Acide glutamique-Leucine-Arginine) dans la séquence d'acides aminés. Les chimiokines CXC ELR (+) ciblent en particulier les neutrophiles exprimant les récepteurs CXCR1 et CXCR2. L'ensemble des récepteurs reconnus par les chimiokines du groupe CXC sont présentés dans le tableau 4. Les membres de ce groupe sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires, et leur expression est sous le contrôle de nombreux facteurs. L'exemple de l'IL-8 sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Le groupe CC réunit les chimiokines dont les deux résidus cystéines de la partie N-terminale de la protéine sont adjacents. Les chimiokines de ce groupe attirent préférentiellement les cellules mononuclées. Les représentants de ce groupe et leurs cibles sont présentés dans le tableau 5. L'exemple de MIP-1 $\beta$  sera présenté dans le paragraphe 1.4.3.

Le groupe CX<sub>3</sub>C correspond à la fractalkine, dont les deux résidus cystéines de la partie N-terminale sont séparés par trois acides aminés. Sa forme soluble est connue pour avoir une forte activité chimiotactique sur les cellules T et les monocytes (Rollins, 1997). Le groupe C est composé de la lymphotactine, doté d'un seul résidu cystéine en partie N-terminal. La lymphotactine est un puissant chimioattractant pour les lymphocytes T et non pour les monocytes.

**Tableau 3 : Chimiokines membres des sous-groupes ELR (+) et ELR (-) du groupe CXC et leurs principales cellules cibles. (Rollins, 1997)**

	Nom	Principales cellules cibles
ELR (+)	IL-8	Neutrophiles, lymphocytes T et B, basophiles
	GRO $\alpha$	Neutrophiles, mélanomes
	GRO $\beta$	Neutrophiles
	GRO $\gamma$	Neutrophiles
	ENA-78	Neutrophiles
	GCP-2	Neutrophiles
	CTAP-III	Fibroblastes
	$\beta$ -thromboglobuline	Fibroblastes
	NAP-2	Neutrophiles, basophiles
ELR (-)	Platelet factor 4	Fibroblastes, cellules endothéliales, lymphocytes T activés
	IP-10	Cellules endothéliales, cellules NK
	MIG	Lymphocytes T activés
	SDF-1 $\alpha$	Lymphocytes

**Tableau 4 : Récepteurs associés aux groupes CXC et CC de la famille des chimiokines. (Rollins, 1997)**

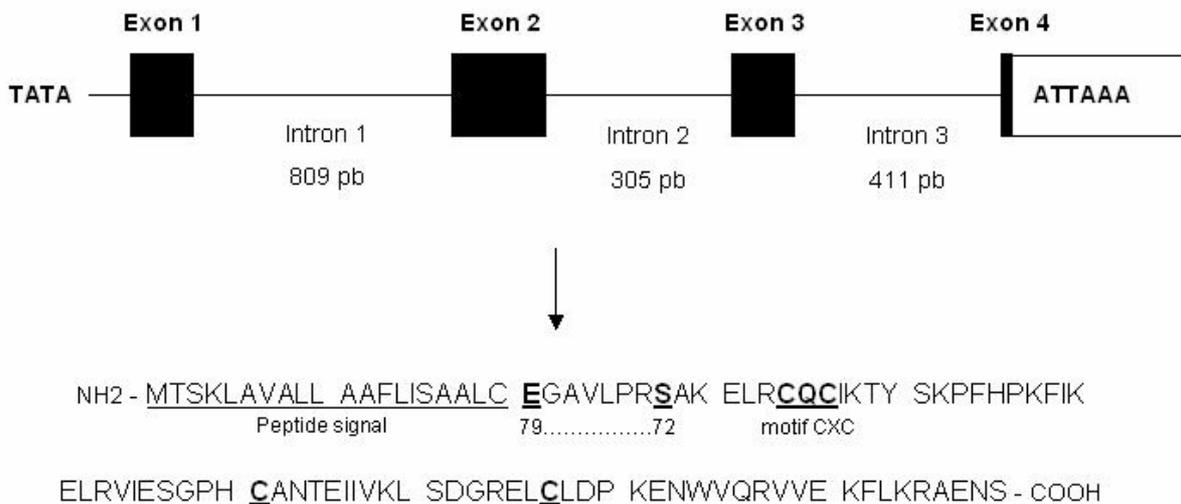
	Nom	Ligands
CXC	CXCR1	IL-8
	CXCR2	IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78
	CXCR3	IP-10, MIG
	CXCR4	SDF-1 $\alpha$
CC	CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-3
	CCR2	MCP-1, MCP-3, MCP-5
	CCR3	Eotaxin, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4
	CCR4	MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1, TARC
	CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
	CCR6	MIP-3 $\alpha$ /LARC
	CCR7	MIP-3 $\beta$ /ELC

**Tableau 5 : Chimiokines membres du groupe CC. (Rollins, 1997)**

Nom	Principales cellules cibles
MCP-1	Monocytes, lymphocytes T mémoire, basophiles, cellules NK, progéniteurs hématopoïétiques, cellules dendritiques
MCP-2	Monocytes, lymphocytes T mémoire et naïfs, éosinophiles, basophiles, cellules NK
MCP-3	Monocytes, lymphocytes T mémoire, éosinophiles, basophiles, cellules NK, cellules dendritiques
MCP-4	Monocytes, lymphocytes T, éosinophiles
MCP-5 (souris seulement)	Monocytes, lymphocytes T, éosinophiles
MIP-1 $\alpha$	Monocytes, lymphocytes T, cellules NK, basophiles, éosinophiles, cellules dendritiques, progéniteurs hématopoïétiques
MIP-1 $\beta$	Monocytes, lymphocytes T, cellules dendritiques, cellules NK, progéniteurs hématopoïétiques
MIP-1 $\gamma$ (souris seulement)	Lymphocytes T
RANTES	Lymphocytes T mémoire, éosinophiles, basophiles, cellules NK, cellules dendritiques
Eotaxin	Eosinophiles
I309	Monocytes
HCC-1	Monocytes, progéniteurs hématopoïétiques
TARC	Lymphocytes T
C10 (souris seulement)	?
CCF18 (souris seulement)	Lymphocytes T, progéniteurs hématopoïétiques
MIP-3 $\alpha$ /LARC	?
MIP-3 $\beta$	?

### 1.4.2- L'interleukine-8 (IL-8) et sa régulation en physiopathologie intestinale

Le gène de l'IL-8, situé sur le chromosome 4, contient 4 exons et 3 introns. La transcription de ce gène donne un ARNm de 1,8 kb conduisant à la formation d'un précurseur protéique de 99 acides aminés. Après le clivage de 20 acides aminés correspondant au peptide signal, la protéine fonctionnelle de 79 acides aminés est sécrétée par la cellule. Il existe des variantes de la protéine IL-8 du côté N-terminal, notamment la variante de 72 acides aminés qui est également fonctionnel. La figure 8 présente la structure du gène de l'IL-8 et la séquence peptidique correspondante.



**Figure 8 : Structure du gène de l'IL-8 et séquence peptidique correspondante.** Le gène est organisé en 4 exons et 3 introns. Dans la séquence peptidique, le peptide signal et les quatre cystéines conservées sont soulignées. (Roebuck, 1999)

#### 1.4.2.1- Importance de la sécrétion d'IL-8 au cours de processus infectieux

La production de chimiokines, telles que l'IL-8, au cours de l'infection par des agents pathogènes semblent être une étape clé de la réponse inflammatoire intestinale. Par exemple, l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-IL-8, au moment de l'infection par *Shigella flexneri* chez le lapin, conduit à une baisse du recrutement des leucocytes polynucléaires et favorise l'invasion bactérienne (Sansonetti et coll., 1999). De même, au cours de l'inflammation par la toxine A du *C. difficile*, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-MIP-2, une chimiokine de la même famille que l'IL-8, réduit la sécrétion de fluides et le recrutement de neutrophiles induit par la toxine (Castagliuolo et coll., 1998a).

Un autre argument montrant l'importance de la sécrétion d'IL-8 au cours de processus infectieux est qu'elle est exprimée rapidement après l'infection, et avant d'autres chimiokines. Ainsi, Yang et coll. (1997) ont montré que l'infection des cellules épithéliales coliques humaines HT-29 et Caco-2 par *Salmonella dublin* augmente en 2 heures l'expression d'IL-8, de GRO $\alpha$  et de GRO $\gamma$ , tandis que l'expression de ENA-78 est retardée de 6 à 10 heures. Kim et coll. (2002) ont également montré que l'expression des ARNm et la sécrétion de l'IL-8 et de GRO $\alpha$  induite par à l'infection par la toxine A du *C. difficile* dans les cellules HT-29 et Caco-2 est précoce et antérieure à l'induction de la production d'autres chimiokines, telles que MCP-1 et ENA-78.

#### 1.4.2.2- Régulation de l'expression de L'IL-8

L'augmentation de l'expression de l'IL-8 a été très abondamment décrite lors de processus infectieux intestinaux ou au cours des MICI. Notamment, les toxines du *C. difficile*

augmentent l'expression de l'IL-8 dans les monocytes et les cellules épithéliales intestinales (Linevsky et coll., 1997 ; Savidge et coll., 2003 ; Kim et coll., 2002) (cf. paragraphe 1.2.3). D'autres pathogènes du tube digestif sont également capables d'induire la sécrétion d'IL-8, notamment par les cellules épithéliales intestinales. Il s'agit en particulier de bactéries entéroinvasives comme *Shigella flexneri*, effet montré sur la lignée épithéliale colique Caco-2 (Sansonetti et coll., 1999), *Salmonella dublin* et *Listeria monocytogenes* sur la lignée T84 (Eckmann et coll., 1993), *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia enteroinvasiva* sur les lignées T84, Caco-2 et HT-29 (Jung et coll., 1995). En revanche, les bactéries non invasives, telles que la souche d'*Escherichia coli* non invasive ou *Enterococcus faecium*, n'induisent pas la sécrétion d'IL-8 par les cellules T84 (Eckmann et coll., 1993). Des éléments de la paroi bactérienne, tels que le LPS, induisent également la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales (Schuerer-Maly et coll., 1994) et les myofibroblastes (Otte et coll., 2003 ; Rogler et coll., 2001). De plus, le butyrate, produit du métabolisme des bactéries, régule également la production d'IL-8 par Fusunyan et coll. (1998) qui ont montré que le butyrate augmente son expression induite par le LPS ou l'IL-1 $\beta$ .

Les MICI ont également été associées à l'augmentation de l'expression de l'IL-8. Mahida et coll. (1992) ont observé que la concentration d'IL-8 dans les homogénats de tissus de patients atteints de rectocolite hémorragique est plus importante que dans les tissus de patients sains ou de ceux présentant une maladie de Crohn. En effet, dans cette étude, les auteurs n'ont pas noté de différences entre les patients sains et ceux présentant des signes de la maladie de Crohn. Izzo et coll. (1992, 1993) ont quant à eux montré une augmentation de la concentration en IL-8 aussi bien dans la muqueuse de patients atteints de la rectocolite hémorragique que dans celle de patients atteints de la maladie de Crohn. Une corrélation positive a de plus été observée entre la concentration d'IL-8, dans des biopsies coliques de ces

patients, et la sévérité de la maladie, Crohn ou rectocolite hémorragique, évaluée par le degré d'inflammation macroscopique, le nombre de neutrophiles et la concentration d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  (Mitsuyama et coll., 1994 ; Daig et coll. 1996). Différentes types cellulaires produisent de l'IL-8 au cours des MICI. Il s'agit principalement des cellules épithéliales intestinales, des macrophages et des neutrophiles de la lamina propria (Mazzucchelli et coll., 1994 ; Grimm et coll., 1996 ; Arai et coll., 1998a).

*1.4.2.3- Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par les médiateurs de l'inflammation intestinale*

Le promoteur du gène de l'IL-8 contient une région essentielle et suffisante au contrôle de son expression. Il s'agit de la région -133 à -1 située dans la portion 5' du gène de l'IL-8. Cette région contient les trois sites de liaison mis en cause dans la régulation de l'expression de l'IL-8 : AP-1 (-126 à -120), NF-IL-6 (aussi appelé C/EBP, -94 à -81) et NF- $\kappa$ B (-80 à -70) (Roebuck, 1999). NF- $\kappa$ B joue un rôle central dans la régulation de l'expression de l'IL-8 tandis que les sites AP-1 et NF-IL-6 ne sont que complémentaires et sont nécessaires seulement pour une induction maximale de l'expression de l'IL-8 (Hoffmann et coll., 2002).

Le tableau 6 résume les différents stimuli pouvant moduler l'expression de l'IL-8 et les voies de signalisation impliquées.

**Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différents stimuli modulant la sécrétion d'IL-8 dans l'intestin.** CEI : cellules épithéliales intestinales, + : augmentation, - : pas d'effet. Les voies de signalisation impliquées dans ces modulations figurent entre parenthèses. Les références de ces études sont mentionnées dans le texte.

Stimulus	Modèles	Effet sur la sécrétion d'IL-8
<u>Maladies infectieuses</u>		
Toxines A et B du <i>C. difficile</i>	Muqueuse colique	+
	CEI primaires, T84, HT-29, HT29 16E	+
	Monocytes primaires, THP-1	+ (p38, NF-κB, AP-1)
	Macrophages	+
<i>Salmonella dublin</i>	HT-29, Caco-2, T84	+
<i>Shigella flexneri</i>	HT-29, Caco-2, T84	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	HT-29, Caco-2, T84	+
<i>Yersinia enterocolita</i>	HT-29, Caco-2, T84	+
<i>Escherichia entéroinvasive</i>	HT-29, Caco-2, T84	+
<i>Enterococcus faecium</i>	T84	-
<i>Escherichia non invasive</i>	T84	-
LPS	Cellules épithéliales intestinales myofibroblastes	+ +
<u>MICI</u>		
Maladie de Crohn	Muqueuse colique	+/-
Rectocolite hémorragique	Muqueuse colique	+
<u>Médiateurs inflammatoires</u>		
IL-1β	Caco-2	+ (p38, NF-κB, JNK)
TNFα	HT-29	+ (p38, ERK1/2, JNK, AP-1, NK-κB)
PGE <sub>2</sub>	T84	+ (APMc, PKA)
<u>Neuromédiateurs</u>		
SP	NCM460	+ (Rho)
Neurotensine	NCM460	+ (Rho, NF-κB, p38, ERK1/2)
VIP	HT-29 16E	+ (p38, ERK1/2)

De nombreux médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  ou les prostaglandines, sont responsables de l'augmentation de l'expression de l'IL-8 (Hoffmann, 2002). Concernant la physiopathologie intestinale, la régulation de l'expression de l'IL-8 a surtout été étudiée dans des modèles de cellules épithéliales intestinales en réponse à ces médiateurs inflammatoires (Parhar et coll., 2003 ; Garat et Arend, 2003 ; Jijon et coll., 2002 ; Warhurst et coll., 1998 ; Yu et Chadee, 1998). Ainsi, l'IL-1 $\beta$  active les voies de signalisation intracellulaires p38 dans les cellules Caco-2 conduisant à l'augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-8. Cependant dans ce modèle, l'activation de p38 n'implique pas NF- $\kappa$ B (Parhar et coll., 2003). L'induction de l'expression de l'IL-8 dans les cellules Caco-2 en réponse à l'IL-1 $\beta$  a également été montrée par Garat et Arend (2003), qui ont de plus observé que l'IL-1ra bloquait cette induction par l'inhibition des voies p38 et NF- $\kappa$ B, sans modifier les voies ERK1/2 et JNK. Le TNF $\alpha$  induit, quant à lui, l'expression des ARNm et la sécrétion de l'IL-8 par les cellules HT-29 par l'activation de p38, ERK1/2, JNK, AP-1 et NF- $\kappa$ B. L'effet de p38 est en particulier impliqué dans la stabilisation des ARNm, car son inhibition entraîne l'accélération de la dégradation des ARNm de l'IL-8, mais n'agit pas sur la liaison de AP-1 et de NF- $\kappa$ B sur l'ADN (Jijon et coll., 2002). L'importance de la voie JNK dans la régulation de l'expression de l'IL-8 a aussi été décrite dans les cellules épithéliales intestinales traitées à l'IL-1 $\beta$  (Böcker et coll., 2000). Les voies de signalisation activées par l'IL-1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$  conduisant à la régulation de l'expression de l'IL-8 sont résumées dans la figure 9. Le rôle des prostaglandines sur l'expression de l'IL-8, notamment celui de PGE<sub>2</sub>, serait quant à lui médié par l'AMPC et la protéine kinase A (PKA) dans les cellules T84 (Yu et Chadee, 1998).

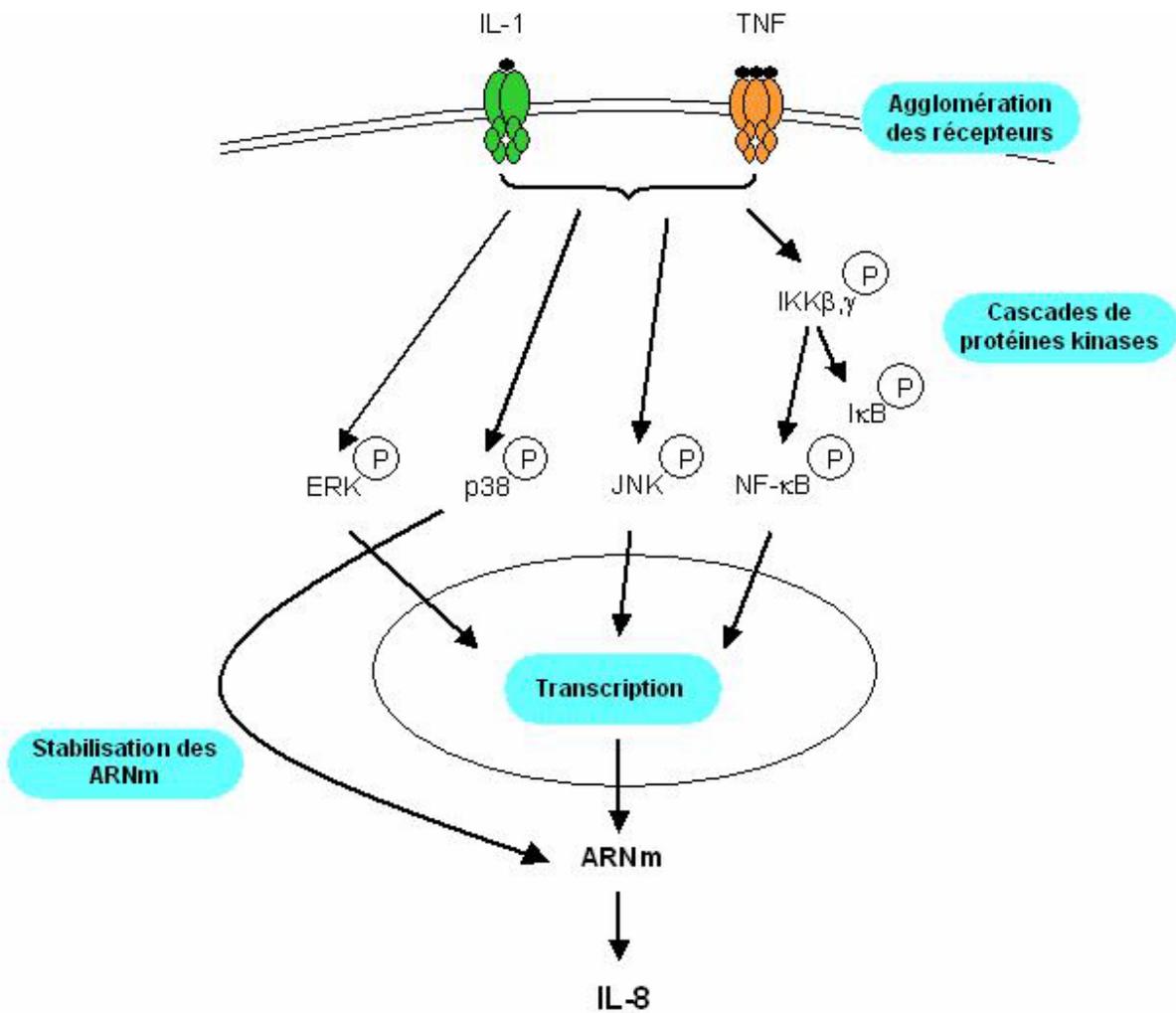


Figure 9 : Schéma simplifié des voies de signalisation intracellulaires activées par l'IL-1β ou le TNFα régulant l'expression de l'IL-8. (d'après Hoffmann, 2002)

Les voies de signalisation p38 et ERK1/2 interviennent dans l'induction de la production d'IL-8 par la toxine A du *C. difficile* dans les monocytes THP-1 (Warny et coll., 2000). Toutefois la toxine A du *C. difficile* semble également utiliser d'autres voies de signalisation pour induire la production d'IL-8 dans les monocytes humains. Jefferson et coll. (1999) ont en effet montré que la toxine A utilise le calcium intracellulaire et active des calmodulines pour induire la sécrétion et l'expression du gène de l'IL-8. Cet effet serait couplé à l'activation de la translocation de NF- $\kappa$ B, notamment de l'hétérodimère p50-p65, et impliquerait AP-1. Dans la lignée de cellules épithéliales intestinales HT-29, He et coll. (2002) ont de plus montré que la toxine A induit la sécrétion d'IL-8 par la génération de radicaux oxygénés libérés par les mitochondries. Celle-ci ne serait pas liée à l'inactivation de Rho mais impliquerait la translocation de NF- $\kappa$ B. L'activation des protéines Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) a cependant été liée à l'induction de la production d'IL-8 dans les cellules NCM460 non transformées par la substance P et la neurotensine (Zhao et coll., 2002, 2003). L'activation du promoteur de l'IL-8 par la neurotensine via les protéines Rho impliquerait NF- $\kappa$ B (Zhao et coll., 2003a). La neurotensine active de plus les voies p38 et ERK1/2 dans les cellules NCM460 non transformées. Le VIP active ces mêmes voies dans les cellules HT-29 clone 16E (Toumi et coll., 2004).

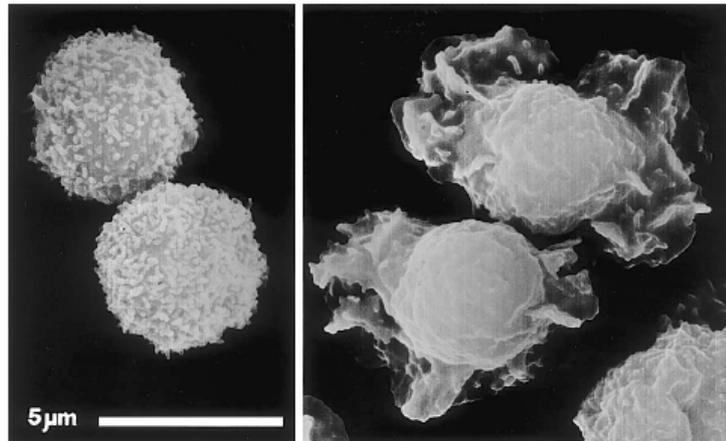
#### *1.4.2.4- Rôles fonctionnels de l'IL-8*

L'IL-8 est l'un des principaux facteurs impliqués dans la chimioattraction des neutrophiles (Baggiolini et coll., 1989). Linevsky et coll. (1997) ont en particulier montré que les surnageants de culture de monocytes traités à la toxine A ou à la toxine B du *C. difficile* induisent la migration de neutrophiles, ce qui est totalement bloqué par l'ajout d'un antisérum dirigé contre l'IL-8. L'IL-8 est également responsable de la migration des lymphocytes T

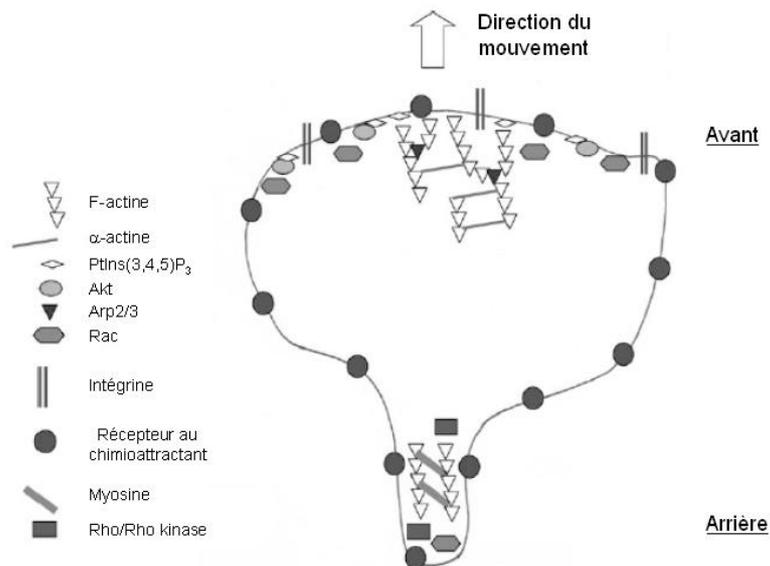
(Larsen et coll., 1989 ; Wang et coll., 1996) et des lymphocytes B (Schratzberger et coll., 1997a).

Les effets de l'IL-8 sur les leucocytes sont médiés par les récepteurs couplés aux protéines liées au GTP, situés à leur surface. L'addition d'IL-8 à des neutrophiles provoque des modifications très rapides de leur cytosquelette. En particulier la polymérisation et la désorganisation de l'actine conduit à la formation de lamellipodes, comme illustré sur la figure 10. La polarisation de la cellule, établie par la formation et la rétraction de ces lamellipodes, permet la migration de la cellule. Ces changements sont caractéristiques du chimiotactisme des leucocytes, dont la direction du mouvement est déterminée par le gradient de concentration de la substance chimiotactique (figure 11). Les voies de signalisation impliquées dans la polarisation des leucocytes sont principalement les protéines Rho et PI<sub>3</sub>Kinases (Niggli, 2003). La stimulation des neutrophiles conduit également à l'expression de molécules d'adhésion, permettant aux leucocytes de traverser les vaisseaux sanguins et d'atteindre les tissus inflammatoires ou infectés. D'autres modifications du phénotype des neutrophiles sont caractéristiques de leur chimiotactisme. Il s'agit de la modification du taux intracellulaire de calcium, de la production de radicaux oxygénés et de lipides, et de la libération de protéases contenues dans leurs granules (Baggiolini, 1999).

D'autres fonctions de l'IL-8 ont également été mises en évidence. Des études ont en effet montré que l'IL-8 stimule la migration d'une lignée colique cancéreuse humaine LIM1215 *in vitro* (Wilson et coll., 1999) et favorise la croissance de cellules épithéliales intestinales cancéreuses HCT116A, HT-29 et Caco-2, de manière autocrine (Brew et coll., 2000). Ces observations suggèrent l'implication de l'IL-8 dans les processus de réparation de la muqueuse colique. Des études ont également montré que l'IL-8 est impliquée dans les processus d'angiogenèse (Gillitzer et Goebeler, 2001).



**Figure 10 : Changement de forme de leucocytes humains vus au microscope électronique à balayage.** A gauche, les leucocytes sont dans une solution saline contrôlée. A droite les leucocytes sont placés en présence d'un chimioattractant. (Baggiolini, 1999)



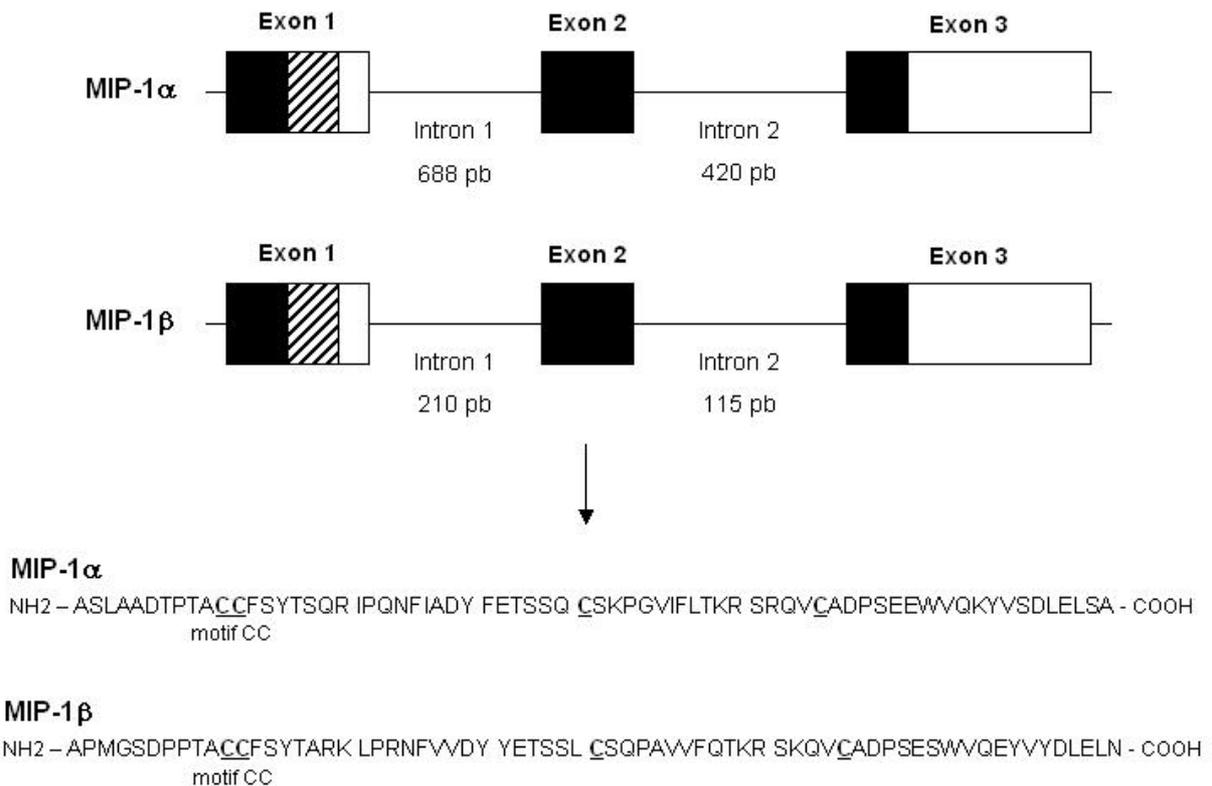
**Figure 11 : Localisation polarisée de protéines de signalisation et de composants du cytosquelette dans la migration des leucocytes.** Tandis que les récepteurs au chimioattractant sont répartis uniformément à la surface de la cellule, la production de PtIns(3,4,5)P3 est localisée et induit la polymérisation de l'actine *via* l'activation de Rac. Akt, une cible de la PI3 kinase est également située au niveau des déformations de la cellule, comme Arp2/3. Les intégrines modulent l'attachement réversible du lamellipode « avant » au substrat et dissocient l'attachement du lamellipode « arrière ». (Niggli, 2003)

Par ailleurs, les chimiokines de la famille de l'IL-8, comme GRO- $\beta$  dont le récepteur est le même que celui de l'IL-8, auraient également un rôle neuromodulateur. En effet, une étude réalisée au moyen d'une culture primaire de cervelet de rat a montré que GRO $\beta$  inhibe l'apoptose induite par des modifications de la concentration en potassium (Limatola et coll., 2000).

### **1.4.3- MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) et sa régulation en physiopathologie**

Les chimiokines MIP-1 sont de petites protéines de 8-10 kDa qui appartiennent au groupe CC de la famille des chimiokines. Les protéines MIP interviennent dans l'inflammation aiguë et chronique par le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires vers le site de l'agression, telles que les cellules T (Maurer et Von Stebut, 2004). Schall et coll. (1993) ont ainsi montré que MIP-1 $\beta$  attire préférentiellement les lymphocytes T, tandis que MIP-1 $\alpha$  attire les lymphocytes B et les cellules T cytotoxiques à faible dose, et les lymphocytes T à forte concentration. A concentration équivalente, MIP-1 $\alpha$  est un chimioattractant plus puissant que MIP-1 $\beta$  (Schall et coll., 1993). MIP-1 $\beta$  et MIP-1 $\alpha$  induisent également la migration des monocytes, MIP-1 $\alpha$  étant, dans ce cas aussi, plus puissant que MIP-1 $\beta$  à des doses équivalentes (Cross et coll., 1997). Ces deux chimiokines ont également été impliquées dans l'attraction des cellules dendritiques et des cellules NK (Maurer et Von Stebut, 2004), et dans la sécrétion d'autres médiateurs inflammatoires, tels que les prostaglandines ou l'histamine (Maurer et Von Stebut, 2004).

Chez l'homme et la souris, MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4), sont codées par des gènes organisés en trois exons et deux introns situés respectivement sur le chromosome 11 et 17 (figure 12). MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  sont synthétisées sous forme d'un précurseur de 92 acides



**Figure 12 : Structure des gènes de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  et séquences peptidiques de la protéine mature correspondante.** Ces gènes sont organisés en 3 exons et 2 introns. Les parties noires correspondent aux séquences non traduites, les parties blanches aux séquences traduites, mais non sécrétées, et la partie hachurée à la séquence traduite de la protéine mature. Les éléments cystéines conservés sont soulignés. (d’après Maurer et Von Stebut, 2004).

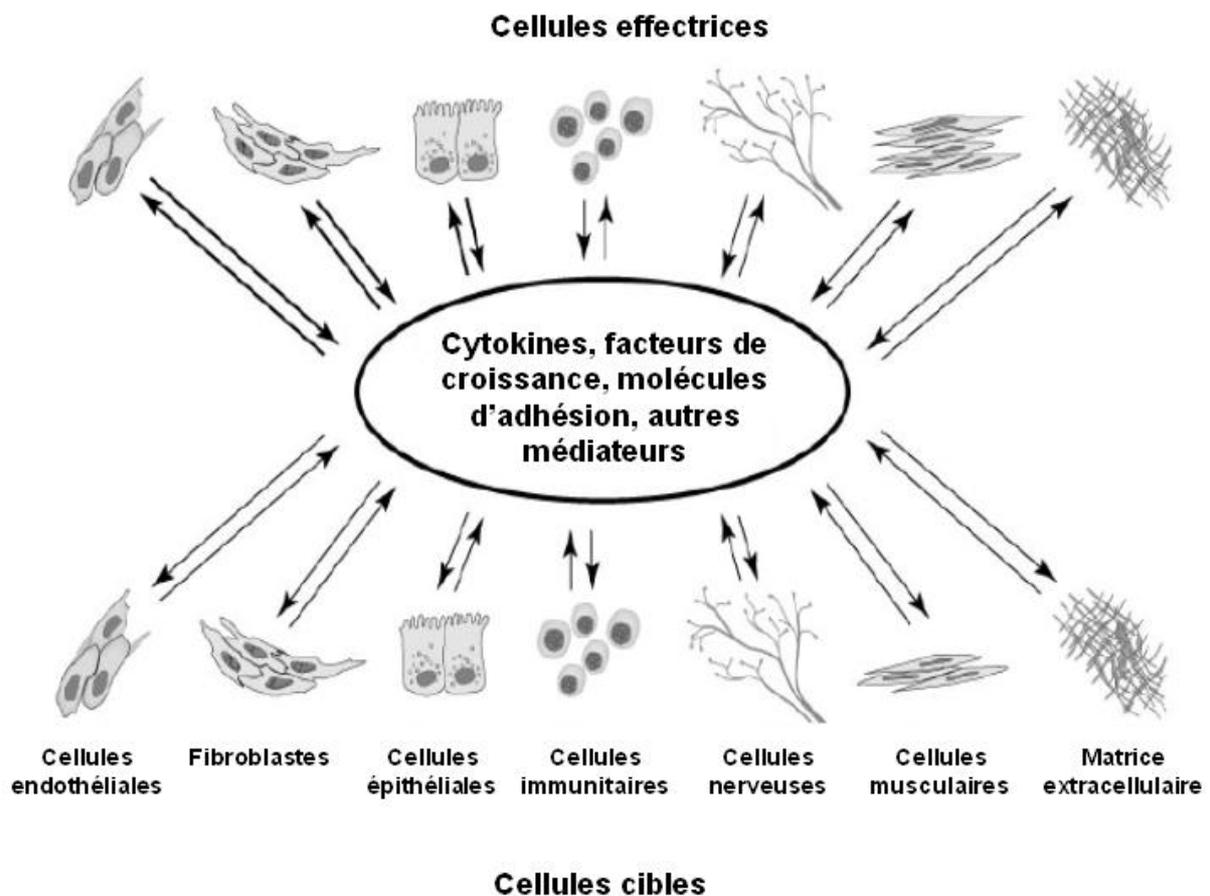
aminés. La forme mature de la protéine (69-70 acides aminés), qui est sécrétée, est générée par des peptidases qui clivent les peptides signaux hydrophobes (Menten et coll., 2002).

Bien que les études concernant la régulation des protéines MIP-1 au cours de l'inflammation intestinale soient moins nombreuses que celles concernant l'IL-8, des modifications de leur expression ont été rapportées au cours de processus inflammatoires intestinaux. Dans des biopsies coliques de patients atteints de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique, une augmentation de l'expression de MIP-1 $\alpha$  et de MIP-1 $\beta$  a été décrite (Banks et coll., 2003). Olsson et coll. (2000) ont quant à eux montré par une étude immunohistochimique que la muqueuse colique de patients infectés par le VIH présente une inflammation, caractérisée notamment par une augmentation de l'expression de MIP-1 $\alpha$  et de MIP-1 $\beta$ , et du nombre de cellules T dans la lamina propria. Des observations similaires ont été faites chez des patients présentant une MICI (Olsson et coll., 2000).

Chez la souris, l'infection par la toxine A du *C. difficile*, conduit également à une augmentation de l'expression de MIP-1 $\alpha$  dans l'iléon (Ishida et coll., 2004). Une induction de l'expression de MIP-1 $\beta$  a de plus été montrée dans les cellules épithéliales intestinales chez la souris infectée par *Cryptosporidium parvum* (Lacroix-Lamandé et coll., 2002). Des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  régulent l'expression de MIP-1 $\beta$  dans les hépatocytes (Zhang et coll., 2003) et dans une lignée neuronale humaine NT2-N (Guo et coll., 2003). Dans ces deux études, NF- $\kappa$ B a été identifié comme un élément clé de la régulation de l'expression de MIP-1 $\beta$  par l'IL-1 $\beta$ .

**1.5- Les interactions entre les cellulaires immunitaires et non immunitaires au cours de l'inflammation intestinale**

L'inflammation intestinale a longtemps été considérée comme étant simplement le fait du système immunitaire, indépendant de l'intervention de son environnement cellulaire. Cependant, l'intestin est un organe complexe, comprenant une multitude de types cellulaires interagissant les uns avec les autres (Fiocchi, 1997). L'inflammation intestinale est donc maintenant considérée comme étant la résultante d'interactions complexes entre les différents types cellulaires peuplant l'intestin, immunitaires ou non immunitaires (figure 13).



**Figure 13 : Interactions multidirectionnelles entre cellules effectrices et cellules cibles en physiologie et physiopathologie intestinale. (Fiocchi, 1997).**

Néanmoins, seules quelques études établissent des preuves directes de l'existence d'interactions entre les différentes composantes du tube digestif au cours de l'inflammation. Par exemple, une étude récente a montré que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de la lamina propria interagissent avec les cellules épithéliales intestinales au cours de l'infection par le parasite *Toxoplasma gondii*, ce qui conduit à une altération de la production de chimiokines et favorise l'invasion du parasite (Mennechet et coll., 2002). Au cours de l'infection par la toxine A du *C. difficile*, une étude a montré que la coculture de la lignée épithéliale colique avec des myofibroblastes sous-épithéliaux restaure le niveau de la résistance trans-épithéliale abaissée par la toxine A. Cet effet serait médié par le TGF $\beta$  (Johal et coll., 2004). De même, la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  est réduite lors de la coculture de cellules épithéliales intestinales (HT29, HCT116, Colo-320 ou Caco-2) avec des cellules endothéliales (HMEC-1). Cet effet impliquerait également le TGF- $\beta$  (Lugering et coll., 1998).

Un nombre croissant d'études suggère que ces différents types cellulaires formant le tube digestif interagissent avec une autre composante clé de la paroi intestinale, le système nerveux entérique, aussi bien en physiologie qu'en physiopathologie intestinale. La suite de cette étude bibliographique sera donc centrée sur l'étude du système nerveux entérique en physiologie et physiopathologie intestinale.

## **2- Le système nerveux entérique**

### **2.1- Découverte du système nerveux entérique (SNE) et historique**

La neurogastroentérologie, discipline qui étudie le SNE, a débuté , à la fin du XIXème siècle, par la découverte du rôle fonctionnel du SNE par W. M. Bayliss et E. H. Starling. Chez des chiens anesthésiés, ces auteurs ont isolé des anses d'intestin qu'ils ont soumises à une pression exercée au niveau de la lumière intestinale. Ils ont observé une contraction du côté oral suivie d'une relaxation du côté anal, qui s'accompagnait d'un mouvement du contenu luminal. Bayliss et Starling ont appelé ce phénomène « la loi de l'intestin », phénomène qui est, de nos jours, connu sous le terme de « réflexe péristaltique » (Bayliss et Starling, 1899 ; Bayliss et Starling, 1900a ; Bayliss et Starling, 1900b). De plus, ces auteurs, en sectionnant tous les nerfs communiquant entre le système nerveux central et l'intestin, ont observé que le réflexe était maintenu. Ils introduirent alors le terme de « mécanisme nerveux local ». Ces résultats ont été confirmés chez le cobaye sur des anses isolées d'intestin (Trendelenburg, 1917).

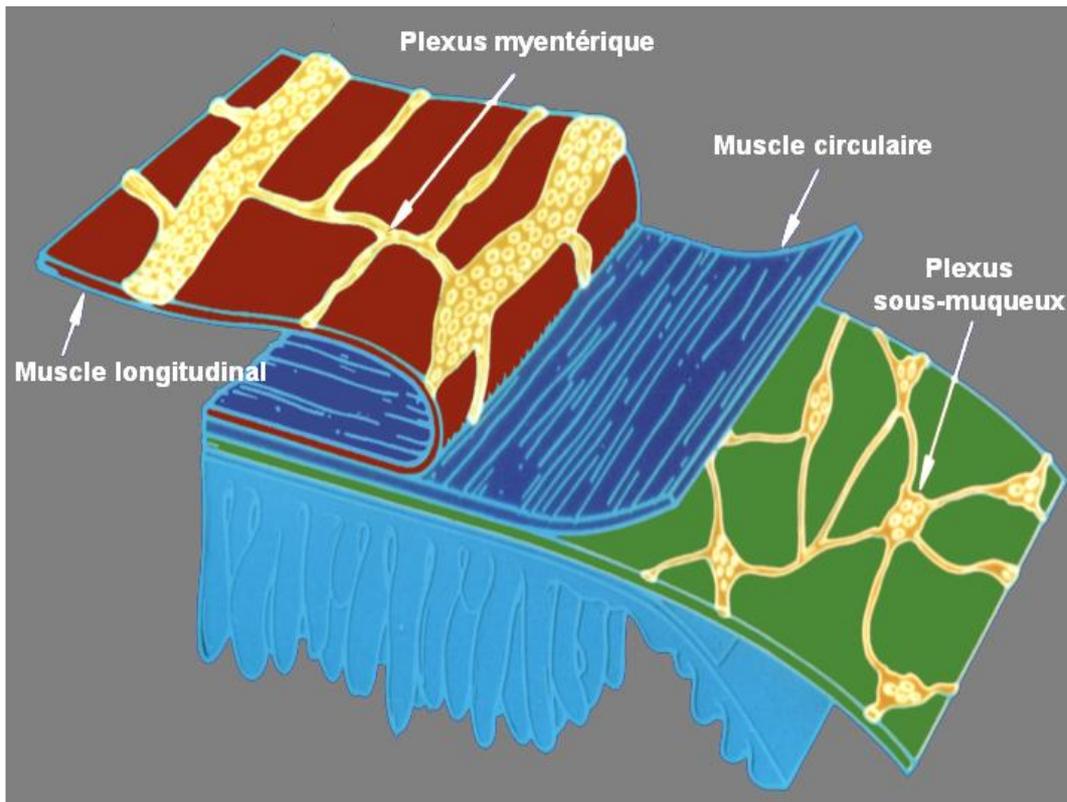
L'existence de neurones dans la paroi de l'intestin a été mise en évidence par L. Auerbach et G. Meissner environ 50 ans plus tôt. Des marquages à l'argent réalisés par R.Y. Cajal ont permis d'établir que les neurones de l'intestin étaient de différents types morphologiques. La classification a été effectuée par A.S. Dogiel selon leur microarchitecture. La compréhension des caractéristiques neurochimiques du SNE a été initiée par J.N. Langley qui a cartographié le système nerveux autonome. Ce dernier a décrit le SNE comme une troisième division du système nerveux autonome en 1921. Dans les années suivantes, le SNE a néanmoins été considéré comme un simple relais post-ganglionnaire du système nerveux autonome (Hansen, 2003). Ce n'est qu'à partir des années

1970 que les travaux de Gershon, Costa, Furness, Wood et North ont permis un plein essor de la caractérisation du SNE et de ses rôles, grâce au développement d'une part des techniques d'immunohistochimie et de traçage neuronal, et, d'autre part, des techniques d'électrophysiologie et de neuropharmacologie.

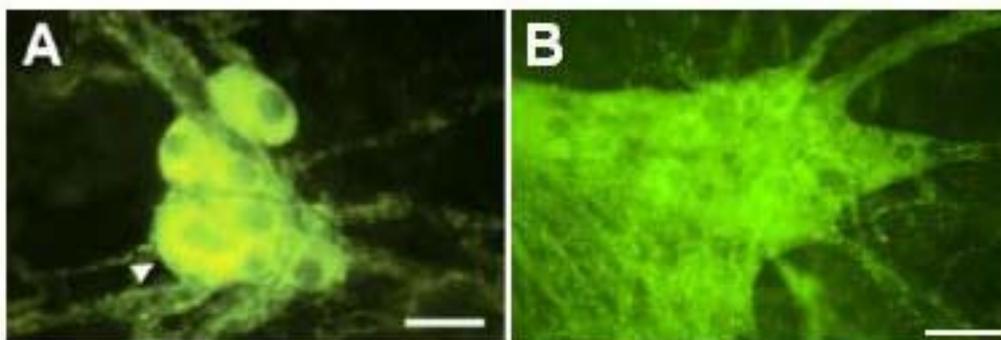
## **2.2- Caractéristiques générales du SNE**

### **2.2.1- Organisation du SNE**

L'organisation du SNE varie selon le segment du tube digestif et selon l'espèce (Timmermans et coll., 1997). Le SNE est organisé principalement en deux plexus : le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique, également appelé plexus d'Auerbach (figure 14). Au sein des plexus, les neurones sont organisés en ganglions reliés entre-eux par des fibres interganglionnaires. Le plexus sous-muqueux, situé sous la muqueuse, n'est présent que dans l'intestin. Chez le cobaye, un seul plexus sous-muqueux est distingué, tandis qu'il en existe deux chez le porc, et trois chez l'homme (Timmermans et coll., 1997 ; Wedel et coll., 1999). Ces trois plexus sous-muqueux humains sont (1) le plexus de Meissner situé directement sous la muqueuse, (2) le plexus intermédiaire, et (3) le plexus de Henlé accolé au muscle circulaire. Ces trois plexus, reliés entre eux par des interconnexions, sont considérés comme étant une unité fonctionnelle, bien qu'ils présentent des différences anatomiques et neurochimiques. Le plexus myentérique est localisé entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal, et est présent tout le long du tube digestif. Il contient plus de neurones par ganglions et des fibres interganglionnaires plus épaisses que le plexus sous-muqueux (figure 15).



**Figure 14 : Schéma simplifié de la localisation des plexus sous-muqueux et myentérique dans la paroi intestinale.**



**Figure 15. Marquage immunohistochimique d'un ganglion du plexus sous-muqueux (A) et du plexus myentérique (B).** Les neurones sont marqués par la NSE (Neurone Specific Enolase) et révélés par un anticorps secondaire couplé au FITC. La barre d'échelle correspond à 25  $\mu$ m.

Le plexus sous-muqueux contrôle les fonctions de la muqueuse, notamment les fonctions sécrétoires. Le plexus myentérique contrôle quant à lui principalement la fonction de motricité digestive. Cependant il existe des communications étroites entre ces deux plexus permettant de coordonner les fonctions de sécrétion et de motricité (Cooke et coll., 1993). Ces principales fonctions seront détaillées dans le paragraphe 2.3.

Le SNE forme également des projections vers les ganglions cœliaques et mésentériques (Szurszweski et coll., 2002) et des projections extra-digestives vers le pancréas (Tiscornia, 1977 ; Anglade et coll., 1987 ; Kirchgessner et coll., 1990) et le sphincter d'Oddi de la vésicule biliaire (Mawe et Gershon 1989).

Il existe également des connexions entre le SNE et le système nerveux périphérique sympathique et parasympathique. Les réflexes neuronaux intrinsèques modulant des fonctions intestinales sont également sous la dépendance de modulations par le système nerveux extrinsèque, provenant des fibres sympathiques ou parasympathiques (Wood, 1994).

## **2.2.2- Composants cellulaires du SNE**

Le SNE est composé de trois types cellulaires différents : les neurones, les cellules gliales et les cellules souches neuronales, dont la mise en évidence est très récente (Krüger et coll. 2002).

### *2.2.2.1- Les neurones du SNE*

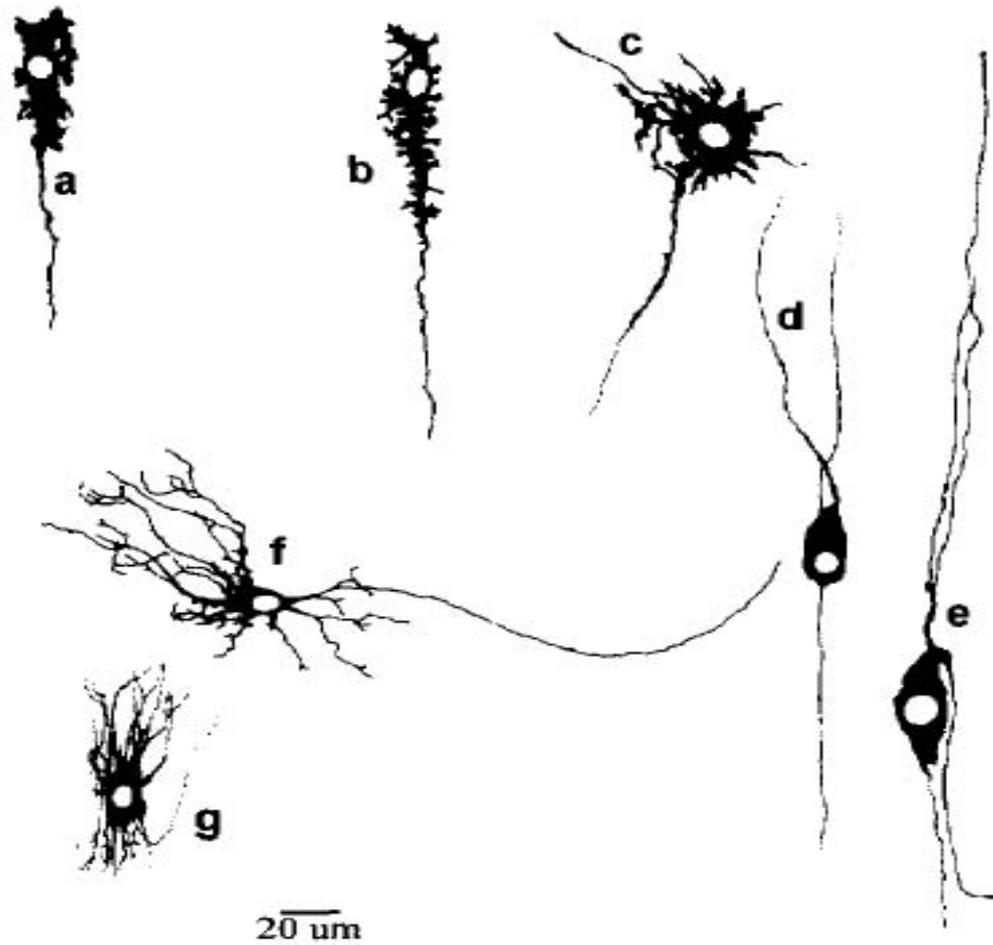
Le SNE contient environ 100 millions de neurones. Les neurones peuvent être classés différemment selon leur morphologie, leur codage neurochimique ou leurs propriétés électrophysiologiques. Ces caractéristiques ont été établies au moyen de différentes

techniques, comme la microscopie, l'immunohistochimie, l'électrophysiologie et le traçage neuronal.

Selon leur morphologie, les neurones sont classés de Dogiel type I à VII et neurones géants. La plupart des neurones sont de types I-III (Furness, 2000) (figure 16). Les neurones de type I possèdent un seul axone et de multiples dendrites courtes et lamellaires. Les neurones de type II sont dotés de plusieurs axones et ne présentent pas de dendrites, et enfin, les neurones de type III possèdent un seul axone et de multiples dendrites longues (Timmermans et coll., 1997).

Les neurones du SNE synthétisent différents neurotransmetteurs ce qui détermine leur codage neurochimique. Plus d'une trentaine de neurotransmetteurs/neuromédiateurs ont été répertoriés dans le SNE et jusqu'à 11 substances différentes ont été identifiées dans un même neurone (Furness, 2000). Ce sont de petites molécules, comme la sérotonine, des peptides, comme le vasoactive intestinal peptide (VIP), ou des gaz, comme le NO. Ils permettent aux neurones de communiquer entre eux ou avec leurs cellules cibles effectrices. Pour un souci de clarté, la fonction de certains de ces neuromédiateurs sera détaillée dans la partie consacrée aux rôles du SNE dans l'homéostasie intestinale (paragraphe 2.3).

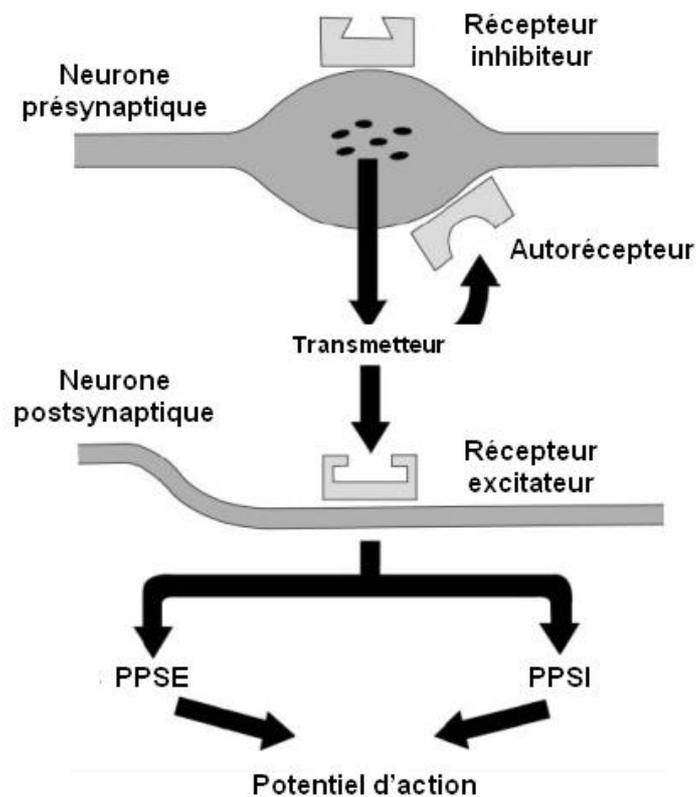
Une autre caractéristique importante des neurones entériques est leur comportement électrophysiologique qui permet de moduler directement la libération de neuromédiateurs (quantité et types de neuromédiateur) à l'interface neuro-neuronale ou neuro-effectrice. Schématiquement, il existe deux types de neurones du point de vue de leur comportement électrophysiologique : les neurones S et les neurones AH (Furness, 2000). Le type S (Synaptique) correspond à des neurones recevant des signaux d'autres neurones *via* des synapses. Ils présentent une morphologie Dogiel de type I. Les neurones AH (AfterHyperpolarization) sont caractérisés par un potentiel d'action, insensible à la



**Figure 16 : Principaux types morphologiques de la classification Dogiel des neurones entériques de l'intestin grêle chez le cobaye. a-c : neurones de type I, uniaxonaux multidendritiques (courtes et lamellaires ; d-e : neurones de type II, adendritiques multiaxonaux ; f : neurones de type III, uniaxonaux et multidendritiques (longues) ; g : neurones filamenteux. (d'après Timmermans et coll., 1997)**

tétradotoxine (TTX), suivi d'une hyperpolarisation tardive, pendant laquelle l'excitabilité du neurone est réduite. Les neurones AH ont une morphologie Dogiel de type II (Furness, 2000). Le comportement électrophysiologique des neurones peut être modulé par d'autres neurones l'innervant. Ces modulations incluent des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) rapides ou lents, des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) (figure 17).

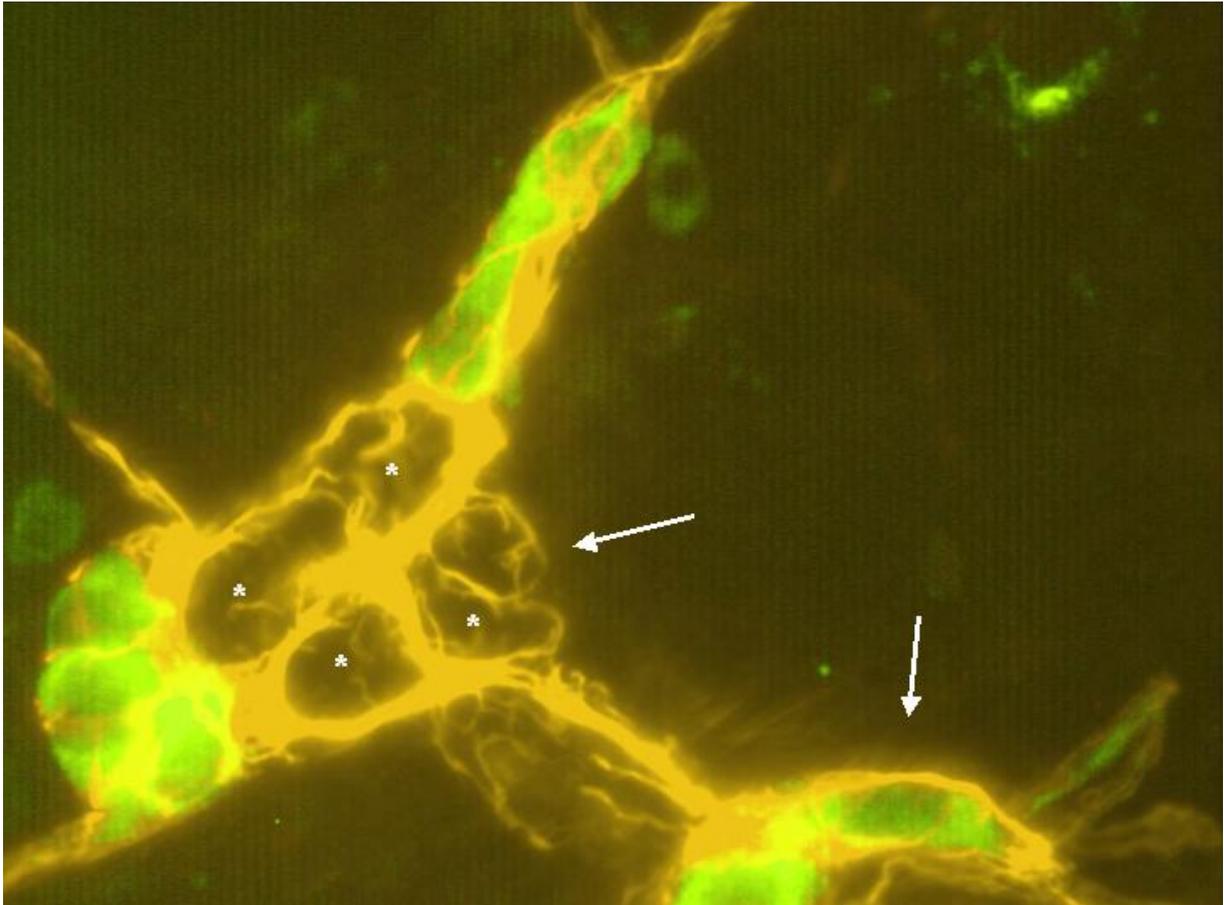
D'un point de vue fonctionnel, les neurones du SNE forment un réseau intégratif, organisé en neurones sensitifs, interneurones et neurones moteurs. Pour plus de clarté, la description du fonctionnement de ces réseaux sera illustrée dans le paragraphe consacré aux rôles du SNE dans l'homéostasie intestinale (paragraphe 2.3).



**Figure 17 : Neurotransmission dans le système nerveux entérique.** PPSE : potentiel postsynaptique excitateur , PPSI : potentiel postsynaptique inhibiteur (Hansen, 2003)

### 2.2.2.2- Les cellules gliales du SNE

Les cellules gliales entériques (CGEs), 4 fois plus nombreuses que les neurones, jouent un rôle structural et de soutien important dans le SNE (figure 18). Elles se situent au niveau des ganglions, où elles encerclent les neurones, et au niveau des fibres interganglionnaires et des prolongements des neurones, qu'ils forment vers la musculature muqueuse, les vaisseaux sanguins et les glandes sécrétrices (Cabarrocas et coll., 2003). Selon leur emplacement, les CGEs présentent des morphologies différentes. Dans les ganglions, elles ont une forme étoilée et de nombreux prolongements courts, tandis que lorsqu'elles sont situées autour des fibres interganglionnaires, elles forment des prolongements plus courts et parallèles aux fibres (Hanani et Reichenbach, 1994). Elles expriment différents marqueurs spécifiques tels que la GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Jessen et Mirsky 1980), et S-100 $\beta$  (calcium binding protein) (Ferri et coll., 1982 ; Jessen et Mirsky, 1983). Une étude *in vitro* a cependant montré que parmi les cellules gliales, exprimant toutes S-100 $\beta$ , seule une sous-population exprime GFAP chez le rat (Von Boyen et coll., 2004). D'autres marqueurs des cellules gliales sont la glutamine synthétase (Jessen et Mirsky 1983), la vimentin (Jessen et Mirsky 1983) et la L-arginine (Nagahama et coll., 2001). Comme le montre le tableau 7, les CGEs présentent beaucoup de similitudes avec les astrocytes du système nerveux central. Par exemple, comme les astrocytes, les CGEs forment des contacts avec la lame basale entourant le ganglion et les vaisseaux sanguins (Hanani et Reichenbach, 1994). Les CGEs sont reliées entre elles par des jonctions communicantes (Maudelj et Hanani, 1992). Un nombre croissant de données suggèrent de plus l'implication des CGEs dans la survie des neurones. En effet, dans un modèle d'ablation de la glie, une neurodégénérescence a été observée (Bush et coll., 1998). Les CGEs pourraient assurer la survie des neurones entre autres par l'approvisionnement de ces derniers en nutriments. La glie est en effet l'unique intermédiaire



**Figure 18 : Marquage immunohistochimique de neurones et de cellules gliales de plexus sous-muqueux chez la souris.** Les cellules gliales, immunoréactives pour la GFAP (Cy3, orange), encerclent les neurones regroupés en ganglions (flèches blanches). Les neurones paraissant en vert (FITC) immunoréactifs pour la choline acétyl transférase (ChAT), les autres (marqués d'une croix blanche) ne sont pas immunoréactifs pour la ChAT.

**Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques des astrocytes du système nerveux central (SNC) avec celles des cellules gliales entériques.** ND : non déterminé. (Cabarrocas et coll., 2003)

Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles	Astrocytes du SNC	Cellules gliales entériques
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme étoilée</li> <li>- Grande plasticité notamment dans l'espace périssynaptique</li> <li>- Deux sous-types</li> <li>- Forment un large syncytium couplé à des jonctions communicantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forme étoilée</li> <li>- Nombreux prolongements enveloppant les groupes de neurones</li> <li>- Deux sous-types</li> <li>- Large syncytium couple à des jonctions communicantes</li> </ul>
Marqueurs	GFAP, Ran-2, vimentin, glutamine synthetase, L-arginine	GFAP, Ran-2, vimentin, glutamine synthetase, L-arginine
Interactions avec les vaisseaux sanguins	Prolongements épais en contact avec les vaisseaux sanguins	Prolongements épais en contact avec les vaisseaux sanguins
Régulation de la perméabilité tissulaire	Induction des propriétés de la barrière hématoencéphalique sur les cellules endothéliales	ND

entre les neurones et les vaisseaux (Maudelj et Hanani, 1992). Elles sont de plus riches en granules de glycogène (Cook et coll., 1976), permettant l'approvisionnement des neurones en glucose ; elles sont également la seule source pour les neurones de L-arginine (Nagahama et coll., 2001), le substrat nécessaire à la synthèse du neuromédiateur NO dans le SNE. Les CGEs pourraient de plus assurer la survie des neurones par la production de facteurs neurotrophiques, comme le GDNF (glial-derived neurotrophic factor) (Bär et coll., 1997). Les CGEs expriment enfin la glutamine synthétase, impliquée dans la détoxification au glutamate (Jessen et Mirsky 1983).

#### *2.2.2.3- Les cellules souches du SNE*

L'existence de cellules souches neuronales entériques a été mise en évidence par Krüger et coll. (2002), chez le rat. Ces cellules, une fois mises en culture, forment des colonies contenant des neurones, des CGEs et des myofibroblastes. De plus, transfectées chez des embryons de poulet, ces cellules permettent de générer des neurones et des CGEs. Ces neurones expriment une variété de neuromédiateurs présents dans le SNE. Bondurand et coll. (2003) ont montré que des progéniteurs de neurones et de cellules gliales entériques sont capables de coloniser un intestin de souris sain ou aganglionique, en culture d'organe.

### **2.2.3- Développement du SNE**

Le SNE dérive de cellules précurseurs des segments vagal, sacré et rosto-troncal de la crête neurale (Gershon, 1998). Les cellules du segment vagal colonisent tout l'intestin, celles du segment sacré migrent uniquement vers l'intestin post-ombilical et celles du segment rosto-troncal colonisent l'œsophage et l'estomac. Les cellules de la crête neurale vagale

colonisent le tube digestif dans le sens rostro-caudal dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme (Burns et coll., 2004). Au cours du développement, l'intervention séquentielle de différents facteurs et de leurs récepteurs permet la différenciation des neurones et des CGEs. Un de ces facteurs est le GDNF, qui se fixe sur le récepteur à activité tyrosine kinase Ret, qui est essentiel à la survie, à la prolifération et à la différenciation durant les étapes précoces du développement du SNE. Une étude récente a en effet montré que le GDNF est sécrété par le tube digestif selon un gradient de concentration rostro vagal précédent le front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan et coll., 2002). Ainsi, une altération ciblée du gène Ret chez la souris a pour résultante l'absence de ganglion entérique et une agenèse rénale (Schuchardt et coll., 1994). Chez l'homme, des mutations du gènes Ret sont associées à des formes de mégacôlon (Romeo et coll., 1994 ; Hofstra et coll., 1994). En particulier, la maladie de Hirschprung, caractérisée par une absence de ganglions entériques dans le côlon distal, est associée à une mutation du gène Ret (Newgreen et Young, 2002). Les récepteurs à l'endothéline-3 et à l'endothéline-B jouent également un rôle important dans la migration et le développement du SNE (Baynash et coll., 1994 ; Hosoda et coll., 1994). Une altération ciblée de ces deux gènes provoque chez la souris un mégacôlon aganglionnaire.

La différenciation des cellules de la crête neurale en neurones ou en cellules gliales commence dès le début de leur migration. Burns et coll. (2004) ont en particulier identifié des marqueurs neuronaux précoces, tels que la NO synthase (NOS) et la sérotonine (5-HT), comme étant exprimés au cours du développement du SNE. Le calcitonin gene-related peptide (CGRP) et la ChAT apparaissent quant à eux plus tardivement.

## **2.3- Rôle du SNE dans l'homéostasie intestinale**

### **2.3.2- Contrôle de la motricité digestive par le SNE**

Bayliss et Starling ont les premiers apporté des preuves d'un réflexe péristaltique dans le côlon de chien (Bayliss et Starling, 1900). Ils ont montré qu'une stimulation mécanique de la paroi colique, ou de celle de l'intestin grêle, induisait une contraction du côté oral et une relaxation du côté anal. Après dénervation extrinsèque, ce réflexe persiste (Furness et coll., 1995), montrant que le SNE contient tous les éléments nécessaires à la mise en place d'un tel réflexe, soit des neurones sensitifs, des interneurones et des neurones moteurs.

L'initiation du réflexe péristaltique débute par une perception sensitive d'un stimulus, mécanique ou chimique au niveau de la muqueuse. Un certain nombre d'évidences montrent que les neurones ne détectent pas directement les changements du contenu luminal, mais que c'est la muqueuse qui leur transmet un signal. En effet, la distension mécanique de la muqueuse entraîne la libération de sérotonine par les cellules entérochromaffines de la barrière épithéliale intestinale, qui agit ensuite sur les terminaisons nerveuses sensitives (Furness et coll., 1998 ; Kirchgessner et coll., 1992). Il s'agit des neurones sensitifs intrinsèques, les IPAN (Intrinsic Primary Afferent Neurone), qui présentent une morphologie de type II dans la classification de Dogiel et un comportement électrophysiologique de type AH (Furness, 2000). Ils sont immunoréactifs pour la ChAT, la SP et la calbindine dans l'iléon de cobaye (Costa et coll., 1996). Les IPAN sont sensibles à trois types de stimuli : les modifications chimiques, les distensions intestinales et les distorsions mécaniques de la muqueuse (Furness et coll., 1999). Bertrand et Bornstein (2002) ont montré que l'ATP pourrait également activer les IPAN du plexus myentérique chez le cobaye. L'activité électrique des IPAN chez le cobaye est modulée par des PPSE lents médiés par des récepteurs

NK-3 (Neunlist et coll., 1999). Les IPAN sont, en effet, connectés entre eux sur toute la circonférence et tout le long du tube digestif afin de coordonner l'activité motrice (Furness et coll., 1998).

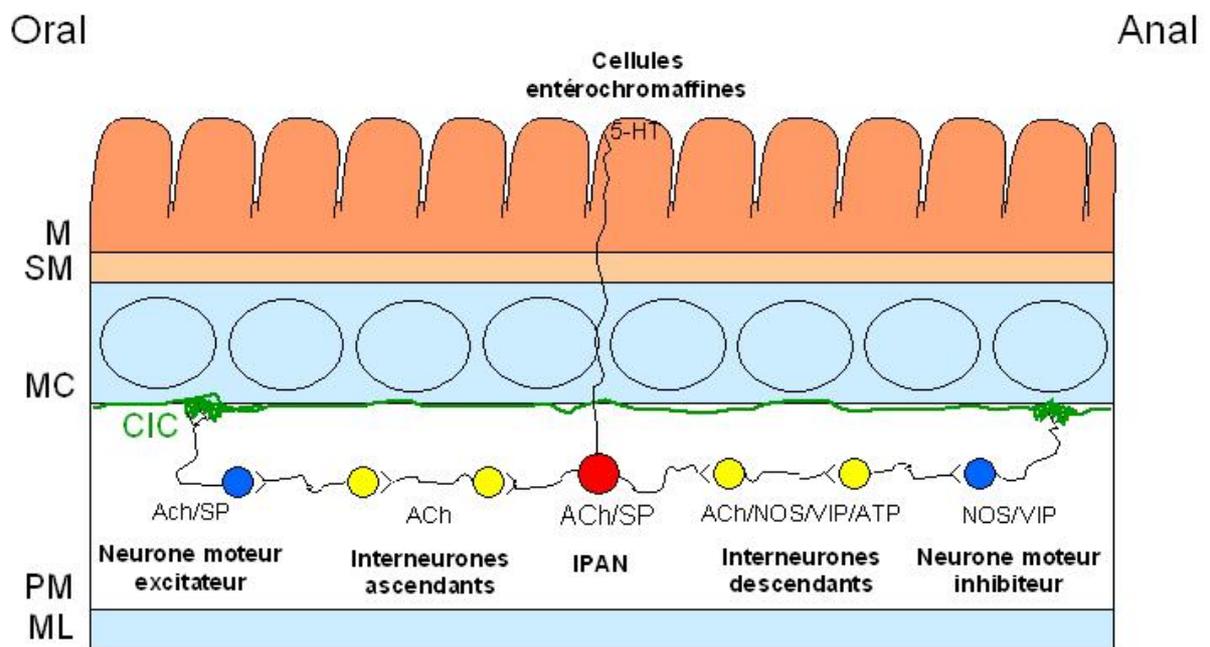
Les IPAN contrôlant le péristaltisme établissent des connections avec les interneurons ascendants et descendants, dont l'axone projette respectivement vers le côté oral et anal. Il existe une seule classe d'interneurones ascendants, immunoréactifs pour la ChAT, la SP et la calrétinine (Brookes et coll., 1997). La transmission entre les interneurons ascendants est médiée par l'ACh, se fixant sur les récepteurs nicotiques nAChR. Les transmissions vers les neurones moteurs excitateurs sont assurées par l'ACh et les tachykinines (récepteur NK<sub>3</sub>) (Bornstein et coll., 2004). Parmi les trois types d'interneurones descendants, dont l'axone projette dans la direction anale, le groupe d'interneurones ChAT/NOS/VIP est impliqué dans le réflexe péristaltique tandis que le groupe ChAT/SOM est impliqué dans la conduction des complexes myoélectriques migrants dans l'intestin grêle (Furness, 2000). Les transmissions émises par les interneurons descendants vers les neurones moteurs inhibiteurs sont largement médiées par l'ATP, *via* son groupe de récepteurs P2X, et peu par l'ACh (Furness et coll., 2000).

Les derniers éléments du circuit neuronal contrôlant le péristaltisme sont les neurones moteurs ascendants ou descendants. Ces neurones présentent une morphologie Dogiel de type I et un comportement électrophysiologique de type S (Furness, 2000). Dans l'intestin grêle de cobaye, les neurones moteurs excitateurs représentent 10% et les neurones moteurs inhibiteurs 12% des neurones myentériques totaux (Costa, 1996). Les neurones moteurs excitateurs contiennent des substances comme l'ACh et les tachykinines, notamment la SP et la neurokinine A, et l'enképhaline, et possèdent des projections longues et courtes (Holzer et coll., 1993 ; Lippi et coll., 1998 ; Furness, 2000). L'activation de ces neurones entraîne une dépolarisation et une contraction du muscle, bloquée par des antagonistes aux récepteurs à

l'ACh et aux tachykinines. L'activation des neurones moteurs inhibiteurs induit une hyperpolarisation et la relaxation du muscle. Dans la plupart des espèces, cette réponse utilise des composantes rapides, médiées par l'ATP, ou lentes, *via* le NO, ou tardives médiées par le VIP (Hansen, 2003).

Les cellules interstitielles de Cajal (CIC) jouent un rôle déterminant dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire. Dans la plupart des régions du tube digestif, un réseau de CIC est localisé dans l'espace inter-musculaire, au niveau du plexus myentérique, entre le muscle circulaire et le muscle longitudinal (Ward et coll., 2004). Elles jouent un rôle de « pacemaker » en générant des ondes lentes de propagation de la motricité intestinale. En effet, une mutation de *c-kit*, un facteur clé dans le développement des CIC, entraîne une perte de l'activité de pacemaker (Ward et coll., 1994 ; Torihashi et coll., 1995). Ces cellules sont innervées par les neurones moteurs entériques et sont capables de répondre à différents neurotransmetteurs (Ward et coll., 2004). Des données récentes montrent que la transmission nerveuse motrice implique peu de connections directes entre les neurones et les muscles, mais impliquent principalement des connections entre les neurones et les CIC, couplées aux muscles par des jonctions communicantes (pour revue voir Ward et coll., 2004).

Les différents circuits nerveux impliqués dans le réflexe péristaltique sont représentés sur la figure 19.



**Figure 19 :** Schéma des voies nerveuses intrinsèques impliquées dans le réflexe péristaltique. M : muqueuse ; SM : sous-muqueuse ; MC : muscle circulaire ; PM : plexus myentérique ; ML : muscle longitudinal ; CIC : cellules interstitielles de Cajal.

### 2.3.3- Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par le SNE

#### 2.3.3.1- Contrôle du transport vectoriel d'électrolytes et de mucus par le SNE

Plusieurs études ont montré que des stimuli mécaniques de la muqueuse colique chez le cobaye et l'homme induisent la sécrétion d'électrolytes, qui est bloquée par la TTX et qui est reproduite par la sérotonine (Sidhu et cooke, 1995 ; Cooke et coll., 1997 ; Kellum et coll., 1999). Des voies nerveuses sensibles intrinsèques, situées dans la sous-muqueuse, et des voies extrinsèques sont impliquées dans ce réflexe (Furness, 2000 ; Weber et coll., 2001). La distension de la muqueuse induirait la libération de sérotonine ou l'activation de récepteurs mécanosensibles. Il en résulte l'activation des terminaisons nerveuses sensibles impliquant les tachykinines et des voies cholinergiques ou non (Kawahara et Cooke, 1990 ; Cooke et coll., 1997 ; Weber et coll., 2001). En particulier, l'étude de Weber et coll. (2001) a montré que la distension de la muqueuse colique chez le cobaye active les neurones sensitifs extrinsèques, ces derniers activant à leur tour les IPAN de la sous-muqueuse *via* la libération de SP, se fixant sur les récepteur NK-1 et NK-3 des IPAN. D'autres neurotransmetteurs, comme le CGRP et la neurotensine, ont également été impliqués dans ce réflexe dans l'intestin grêle de cobaye (Pan et Gershon, 2000 ; Riegler et coll., 2000).

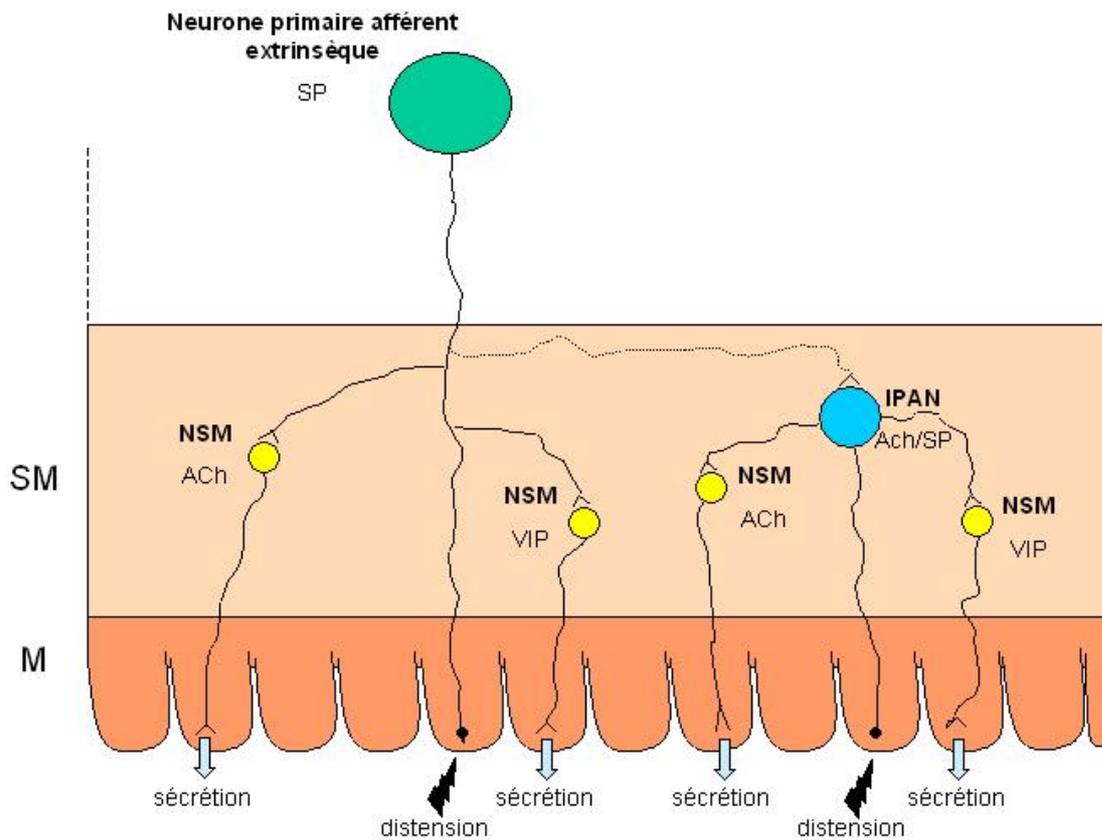
L'activation de ces deux voies sensorielles conduit à l'activation des neurones sécrétomoteurs sous-muqueux. Chez le cobaye, les neurones sécrétomoteurs innervant la muqueuse colique sont polarisés. Une étude a en effet montré que les neurones sécrétomoteurs descendants sont VIPergiques, tandis que les neurones sécrétomoteurs ascendants sont cholinergiques (Neunlist et coll., 1998). Les neuromédiateurs libérés par les

neurones sécrétomoteurs impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'électrolytes colique en réponse à une distension de la muqueuse sont donc le VIP et l'ACh chez le cobaye (Weber et coll., 2001). Les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de la sécrétion chez le cobaye sont schématisés sur la figure 20.

Les neurones sous-muqueux ont également été impliqués dans le contrôle de la sécrétion de mucus par la libération de certains de leurs neuromédiateurs tels que le VIP ou l'ACh (Plaisancié et coll., 1998).

#### *2.3.3.2- Contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium digestif par le SNE*

Des études récentes ont suggéré l'implication de voies nerveuses dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire de la barrière épithéliale intestinale. Ainsi, Crowe et coll. (1993) ont observé que l'augmentation de la perméabilité chez des rats allergiques à l'ovalbumine est inhibée par la TTX. De même, le jeûne du porcelet entraîne une augmentation de la perméabilité au niveau du jéjunum, qui est bloquée par la TTX et par des antagonistes des récepteurs cholinergiques (Hayden et Carey, 2000). Le rôle direct du SNE dans le contrôle de la perméabilité n'a cependant été montré que récemment. Dans un système de coculture composé de sous-muqueuse humaine et de la lignée épithéliale colique HT-29 clone 16E, Neunlist et coll. (2003a) ont montré que la stimulation électrique des neurones sous-muqueux diminue la perméabilité de l'épithélium, ce qui est associé à une augmentation de l'expression de ZO-1. Cet effet passe par l'activation de voies VIPergiques (Neunlist et coll., 2003a).



**Figure 20 : Circuits neuronaux impliqués dans le contrôle nerveux de la sécrétion d'électrolytes chez le cobaye.** SM : sous-muqueuse ; M : muqueuse ; NSM : neurone sécréto-moteur. (d'après Weber et coll., 2001).

L'effet direct de neuromédiateurs sur la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale a également été étudié. Blais et coll. (1997) ont montré, sur des lignées épithéliales coliques humaines (Caco-2, HT-29 clone 19A), que le VIP diminue la perméabilité tandis que l'acétylcholine l'augmente. Hällgren et coll. (1998) ont quant à eux montré que la neurokinine A augmente la perméabilité dans le duodénum de rat, effet qui est inhibé par le VIP.

#### 2.3.3.3- Contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium par le SNE

Des études récentes ont montré l'implication du SNE dans la régulation de la prolifération de la barrière épithéliale intestinale. En particulier, Bjerknes et Cheng (2001) ont montré que les effets trophiques du GLP-2, facteur impliqué dans les processus de croissance et de réparation de la barrière épithéliale intestinale, sont probablement médiés par le SNE. Ainsi, les effets du GLP-2 sur des progéniteurs de cellules épithéliales intestinales sont bloqués par la TTX. Les neurones intrinsèques serviraient d'intermédiaire par la fixation de GLP-2 sur des récepteurs situés à leur surface, ce qui induit l'expression de c-fos, un marqueur d'activation neuronale. Le SNE est également capable de contrôler directement la prolifération de l'épithélium digestif. En effet, dans un modèle de coculture sous-muqueuse humaine/HT-29 clone 16E, Toumi et coll. (2003) ont montré que l'activation électrique des neurones diminue la prolifération des cellules épithéliales par une voie VIPergique. L'effet direct de neuromédiateurs a également été étudié. Ainsi l'implication de la somatostatine a été suggérée car des antagonistes de ce neuropeptide bloque la prolifération des cellules épithéliales intestinales *in vivo* (Pawlikowski 1993 ; Thompson 1993 ; Castell 2001). Dignass et coll. (1998) ont de plus montré que l'ADP et l'ATP augmentent la prolifération des cellules

épithéliales intestinales *in vitro*. Le VIP et le PACAP diminuent quant à eux la prolifération de 4 lignées épithéliales coliques (Lelièvre et coll., 1998).

Les CGE semblent également être impliquées dans la régulation de la prolifération de l'épithélium digestif. Ainsi, Steinkamp et coll. (2003) ont montré que le GDNF, un facteur neurotrophique sécrété par les cellules gliales, possède des propriétés anti-apoptotiques sur les lignées épithéliales coliques HT-29 et SW480. Une étude récente a de plus apporté des preuves directes du contrôle négatif de la prolifération de différentes lignées épithéliales intestinales par les CGEs dans un modèle de coculture cellules épithéliales intestinales/CGEs (Neunlist et coll., 2004).

#### *2.3.3.4- Contrôle du flux sanguin intestinal par le SNE*

Le contrôle du flux sanguin intestinal résulte de la modulation de la balance vasoconstriction/vasodilatation des artérioles situées dans la sous-muqueuse. Dans l'intestin grêle et le côlon, le contrôle nerveux de la vasoconstriction est assuré exclusivement par des fibres nerveuses extrinsèques sympathiques provenant des ganglions cœliaques et mésentériques, *via* l'ATP qui active les récepteurs P2X des artérioles (Vanner et Surprenant, 1992 et 1996).

Le réflexe vasodilatateur fait quant à lui appel à des voies nerveuses intrinsèques et extrinsèques. Le contrôle extrinsèque de la vasodilatation des artérioles fait intervenir la SP et le CGRP libérés par les terminaisons nerveuses extrinsèques sensibles à la capsaïcine (Vanner, 1994). Le contrôle intrinsèque du réflexe vasodilatateur implique principalement le plexus sous-muqueux (Jiang et Surprenant, 1992 ; Vanner et Surprenant, 1991 ; Galligan et coll., 1990). Cependant, la participation de neurones du plexus myentérique a également été

suggérée dans l'activation de neurones vasodilatateurs sous-muqueux conduisant à la dilatation des artérioles (Vanner et coll., 2000).

La réponse vasodilatatrice induite par la stimulation de la muqueuse est bloquée par l'ajout simultané d'antagonistes des récepteurs à la sérotonine 5-HT<sub>3</sub> et 5-HT<sub>4</sub>, suggérant l'implication de voies dépendantes de la sérotonine dans l'activation des IPAN sous-muqueux (dotés du récepteurs 5-HT<sub>4</sub>) et des IPAN myentériques (dotés du récepteurs 5-HT<sub>3</sub>) (Reed et Vanner, 2003 ; Vanner et Macnaughton, 2004). L'innervation intrinsèque des artérioles de la sous-muqueuse dans l'intestin grêle de cobaye est cholinergique muscarinique. L'activation des récepteurs muscariniques M3 par l'acétylcholine induit la libération de NO qui provoque la vasodilatation de l'artérioles (Andriantsitohaina et surprenant, 1992). Dans le côlon distal de cobaye, Vanner et Surprenant (1991) ont identifié, en plus de l'innervation cholinergique, une composante non-cholinergique supplémentaire intervenant dans la vasodilatation, impliquant le VIP et la SP.

### **3- Rôles du système nerveux entérique au cours de l'inflammation intestinale**

Un nombre croissant d'études suggère l'implication du SNE dans les maladies inflammatoires intestinales, d'origine chronique ou infectieuse. Ainsi, des voies nerveuses joueraient un rôle important dans les phases d'initiation de la réponse inflammatoire. De plus, l'activité du SNE serait modulée, voire altérée, lors de processus inflammatoires intestinaux, conduisant à l'émergence de troubles fonctionnels de la motricité et de la sécrétion d'électrolytes.

#### **3.1- Rôles des voies nerveuses dans l'initiation et le contrôle de l'inflammation intestinale**

##### **3.1.1- Mise en évidence de l'intervention de voies nerveuses au cours de l'inflammation intestinale**

Des études récentes menées par différentes équipes ont montré que la réponse intestinale à différents pathogènes est orchestrée par des cascades cellulaires complexes impliquant le système nerveux. En particulier, l'implication de voies nerveuses extrinsèques dans le développement de la réponse inflammatoire causée par la toxine A du *C. difficile* a largement été décrite. En effet, l'inhibition des fibres extrinsèques sensibles, par la capsaïcine, ou la dénervation chirurgicale du système nerveux extrinsèque diminuent les manifestations de l'infection par la toxine A chez le rat, telle que l'inflammation, mesurée par l'activité de la myéloperoxydase, et la sécrétion de fluides (Castagliuolo et coll., 1994 ; Mantyh et coll., 2000). De plus, l'utilisation d'antagonistes de neurotransmetteurs

caractéristiques des fibres sensibles extrinsèques, tels que la SP ou le CGRP, avant l'infection par la toxine A, inhibe également l'inflammation (Pothoulakis et coll., 1994 ; Keates et coll., 1998). La synthèse de la SP et du CGRP est d'ailleurs augmentée dans les ganglions de la racine dorsale 1 heure après le début de l'infection par la toxine A (Castagliuolo et coll., 1997 ; Keates et coll., 1998). Le récepteur NK-1 à la SP semble également capital dans l'initiation des manifestations pathologiques liées à la toxine A du *C. difficile*. Chez des souris génétiquement déficientes pour le récepteur NK-1, la toxine A n'induit ni altération de l'épithélium, ni augmentation de la sécrétion de fluides, ni inflammation (Castagliuolo et coll., 1998b). Pothoulakis et coll. (1998) ont de plus montré une augmentation de l'expression du récepteur NK-1 30 minutes après l'ajout de la toxine A dans la muqueuse intestinale, en particulier dans les cellules épithéliales intestinales. Cette induction est inhibée suite au prétraitement des rats avec l'antagoniste CP-96.345, suggérant que l'induction de NK-1R est dépendante de la SP (Pothoulakis et coll., 1998). Mantyh et coll. (1996a) ont également montré que l'expression des récepteurs à la SP est massivement induite dans les vaisseaux sanguins et les organes lymphoïdes suite à l'infection par la toxine A du *C. difficile*. Dans un autre modèle infectieux, l'injection d'un anticorps neutralisant anti-SP ou l'utilisation d'un antagoniste du récepteur à la SP protège les souris de l'inflammation induite par *Trichinella spiralis*, suggérant là aussi un contrôle nerveux de l'inflammation (Agro et Stanisz, 1993 ; Kataeva et coll., 1994).

L'implication de voies nerveuses dans le développement des MICI a également été suggérée, en dépit de preuves directes chez l'homme, grâce aux études réalisées dans des modèles animaux de colite. Ainsi, l'inhibition du récepteur à la SP ou un antagoniste du neuropeptide Y (NPY) réduit les manifestations inflammatoires induites par le DSS (Dextran Sodium Sulfate) chez le rat ou la souris, suggérant le rôle pro-inflammatoire de ces voies nerveuses dans l'inflammation (Stucchi et coll., 2000 ; Hassani et coll., 2005). De même, un

antagoniste du récepteur à la SP diminue l'inflammation induite par le TNBS (TriNitroBenzene Sulfonic acid) chez le rat (Mc Cafferty et coll., 1994). Cependant, le rôle pro-inflammatoire du système nerveux extrinsèque n'est pas clairement établi. En effet, chez des rats traités au DSS, la capsaïcine augmente les manifestations inflammatoires telles que l'infiltration des neutrophiles, suggérant un rôle protecteur des afférences primaires sensibles à la capsaïcine (Domek et coll., 1997). De plus, dans le modèle TNBS chez le rat, les afférences primaires sensibles à la capsaïcine semblent également jouer un rôle protecteur, tandis que l'altération des nerfs sympathiques par la 6-hydroxydopamine réduit l'état inflammatoire des rats, suggérant le rôle des voies sympathiques dans le développement de la colite (Mc Cafferty et coll., 1997).

L'ensemble de ces données montrent l'implication de voies nerveuses extrinsèques dans l'initiation et le développement de l'inflammation, d'origine chronique ou infectieuse. Concernant le SNE, aucune étude, à notre connaissance, n'a montré son implication directe dans de tels processus. Cependant, des preuves indirectes, telles que l'ablation de la glie entérique, la production de neuromédiateurs ou de cytokines par le SNE, suggèrent qu'il jouerait un rôle dans le contrôle de l'inflammation.

### **3.1.2- Rôles immunomodulateurs potentiels du SNE**

#### *3.1.2.1- Le rôle immunomodulateur des CGEs*

L'importance des CGEs dans le contrôle de l'inflammation a récemment été suggérée par l'étude de deux modèles murins d'ablation de la glie. Dans ces deux modèles, les animaux déclarent une jéjuno-iléite suivie d'une mort rapide. La destruction de la glie dans la région

jéjuno-iléale serait responsable des lésions sévères de la barrière épithéliale intestinale, accompagnées d'une hémorragie intraluminaire (Bush et coll., 1998 ; Cornet et coll., 2001).

Un nombre croissant d'études suggèrent en effet que les CGEs sont impliquées dans la réponse inflammatoire intestinale, au même titre que les astrocytes dans le système nerveux central (tableau 8). Des études ont en effet montré que la glie répond à différents médiateurs inflammatoires. En particulier, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-10 ont été impliqués dans le contrôle de la prolifération des CGEs de rat. L'IL-1 $\beta$  réduit la prolifération des CGEs tandis que l'IL-10 l'inhibe à faible dose et l'augmente à forte dose (Ruhl et coll., 2001a). De plus, l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression et la sécrétion d'IL-6 par les CGEs de rat (Ruhl et coll., 2001b).

Les CGEs peuvent de plus être considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, les CGEs expriment de manière constitutive le CMH de classe I. Geboes et coll. (1992), ont de plus montré que le CMH de classe II est induit dans les CGEs du plexus sous-muqueux et du plexus myentérique au cours de processus inflammatoires tels que la maladie de Crohn, ce qui peut conduire à l'infiltration de cellules T au voisinage des CGEs exprimant le CMH de classe II. Ce résultat a été confirmé *in vitro* par Hollenbach et coll. (2000), qui ont montré que les CGEs n'expriment pas de manière constitutive le CMH de classe II, mais que ce dernier est induit suite au traitement des CGEs par un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ .

Enfin, grâce à la sécrétion de facteurs neurotrophiques, les CGE pourraient être impliquées dans la modulation de l'inflammation intestinale. En effet, dans un modèle murin TNBS, l'utilisation d'anticorps neutralisants NT-3 et le NGF (Nerve Growth Factor) conduit à une augmentation de la sévérité de l'inflammation (Reinshagen et coll., 2000).

**Tableau 8 : Comparaison des caractéristiques des astrocytes du système nerveux central et de la glie entérique en condition physiopathologique. (D'après Cabarrocas et coll., 2003)**

Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles	Astrocytes du SNC	Cellules gliales entériques
Morphologie en physiopathologie	Hypertrophie, hyperplasie, surexpression de GFAP et de la vimentine	Hyperplasie
Production de cytokines	IL-1, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$ et - $\beta$ , TGF- $\beta$	IL-6, IL-1 $\beta$
Production de chimiokines	RANTES, IL-8, MCP-1, IP-10	ND
Expression de CMH	Classe I et II inductible	Classe I et II inductible
Molécules costimulatrices	CD80, CD86, CD40 (controversé)	ND
Voies des antigènes	Classes I et II	Classes I et II
Présentation d'antigènes à :		
Cellules T CD4+ naïves	Dépend de l'addition d'IFN $\gamma$	ND
Cellules T CD4+ activées	Oui	Oui
Cible pour les cellules T CD8+ cytotoxiques	Oui	Oui

### 3.1.2.2- Contrôle de l'inflammation intestinale par les neuromédiateurs

Il n'existe pas, à notre connaissance, de preuves montrant que les neuromédiateurs sécrétés par le SNE jouent un rôle direct dans le contrôle de l'inflammation. Cependant, des données anatomiques ont depuis longtemps suggéré que les neuromédiateurs, libérés par les extrémités nerveuses, sont impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire intestinale. En effet, des études ont montré une forte proximité entre les nerfs, qu'ils soient d'origine intrinsèque ou extrinsèque, et les effecteurs du système immunitaire (Feher et coll., 1997).

Parmi les neuromédiateurs présents dans le SNE et dont l'implication au cours de l'inflammation a été suggérée, deux groupes peuvent être distingués (tableau 9). Le premier groupe, réunissant la SP, le CGRP et le NPY, correspond aux neuromédiateurs ayant des effets pro-inflammatoires. En effet, la SP a été largement impliquée dans la propagation de l'inflammation causée par la toxine A du *C. difficile* (Castagliuolo et coll., 1997 ; Pothoulakis et coll., 1994) ou dans les modèles animaux de MICI (Stucchi et coll., 2000 ; Mc Cafferty et coll., 1994). De plus, au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni* chez la souris, des études ont montré que la SP *via* son récepteur NK-1, joue un rôle crucial dans l'induction de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T stimulées par un antigène, ce qui influence la formation des granulomes et l'expression des IgG2a (Blum et coll., 1993 ; Blum et coll., 1999). La SP induit également la sécrétion de TNF $\alpha$  par les macrophages de la lamina propria par un effet paracrine ou autocrine après injection de la toxine A du *C. difficile* dans la lumière intestinale d'iléon de rat (Castagliuolo et coll., 1997). Des études *in vitro* ont également montré que la SP induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires.

**Tableau 9 : Neuromédiateurs pro- et anti-inflammatoires présents dans le SNE.** Les études mentionnées dans ce tableau sont citées dans le texte.

Effets	Neuromédiateurs	Modèles
<u>Pro-inflammatoires</u>	SP	<i>In vivo</i> : Toxine A du <i>C. difficile</i> , <i>Shistosoma mansoni</i> , TNBS, DSS <i>In vitro</i> : cellules mononuclées du sang périphérique, macrophages, neutrophiles et colonocytes
	CGRP	<i>In vivo</i> : Toxine A du <i>C. difficile</i> , <i>In vitro</i> : cellules mononuclées du sang périphérique et macrophages
	NPY	<i>In vivo</i> : DSS
<u>Anti-inflammatoires</u>	VIP	<i>In vivo</i> : TNBS, endotoxine <i>In vitro</i> : macrophages
	PACAP	<i>In vivo</i> : endotoxine <i>In vitro</i> : macrophages
	Somatostatine	<i>In vivo</i> : <i>T. spiralis</i> <i>In vitro</i> : cellules épithéliales intestinales

Ainsi, la SP augmente la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les cellules mononuclées du sang périphérique ou les macrophages (Cuesta et coll., 2002 ; Laurentzi et coll., 1990 ; Yaraee et coll., 2003), et l'IL-8 par les neutrophiles (Serra et coll., 1994). Une étude suggère cependant que seuls les monocytes activés au LPS peuvent répondre à la SP en sécrétant des cytokines, telles que l'IL-6 (Lieb et coll., 1996). La SP est également capable d'induire la sécrétion d'IL-8 par les colonocytes NCM460 non transformés transfectés avec l'ADNc du récepteur NK-1, *via* la famille des Rho Kinases (Zhao et coll., 2002) et par l'activation de la PKC (Koon et coll., 2005).

Un autre neuromédiateur ayant des effets pro-inflammatoires est le CGRP. L'effet pro-inflammatoire du CGRP a en particulier été montré lors de l'infection par la toxine A du *C. difficile* chez le rat (Keates et coll., 1998). Des études *in vitro* ont de plus montré que le CGRP augmente la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF $\alpha$  par les cellules mononuclées du sang périphérique et les macrophages (Cuesta et coll., 2002 ; Yaraee et coll., 2003). Le neuropeptide Y serait également responsable d'effets pro-inflammatoires au cours de la réponse inflammatoire intestinale. Ainsi, chez des souris traitées au DSS, un antagoniste du récepteur Y1 du NPY atténue l'inflammation. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris invalidées pour le gène du récepteur Y1 (Hassani et coll., 2005).

Le second groupe de neuromédiateurs impliqués dans le contrôle de l'inflammation intestinale concerne les neuromédiateurs ayant un effet anti-inflammatoire tel que le VIP, le PACAP et la somatostatine (tableau 8). Une étude récente, menée *in vivo*, a en effet montré que le VIP, injecté par voie intra péritonéale, diminuait les signes cliniques et histologiques de l'inflammation causée par le TNBS chez la souris (Abad et coll., 2003). Les effets du VIP passeraient par la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires de type TH-1, telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-12, et l'augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires de type TH-2 telles que l'IL-10 ou l'IL-4 (Abad et coll., 2005). D'autres

études menées *in vitro* ont montré l'implication du VIP dans la régulation de la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires. Dans les monocytes humains THP-1, le VIP diminue la production d'IL-8 par inhibition de la voie dépendante de NF- $\kappa$ B (Delgado et Ganea, 2003). De plus, le VIP et le PACAP inhibent la sécrétion de chimiokines du groupe CXC (MIP-2 et KC) et du groupe CC (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 et RANTES) par l'inhibition de la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN *in vitro* et *in vivo*, ce qui conduit à une baisse du recrutement de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes dans un modèle de péritonite aiguë chez la souris (Delgado et Ganea, 2001). Le VIP et le PACAP diminuent également la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages de souris stimulés par de fortes doses de LPS (Delgado et coll., 1999 ; Martinez et coll., 1998). La somatostatine peut quant à elle inhiber la dégranulation des mastocytes au cours de l'infection par *T. spiralis* (Saavedra et Vergara, 2002). De plus, la sécrétion d'IL-8 et d'IL-1 $\beta$  par les cellules HT-29 et Caco-2, spontanée ou induite par le TNF $\alpha$  ou *Salmonella* type D est réduite par la somatostatine (Chowers et coll., 2000).

Par ailleurs, des études ont montré que les neuromédiateurs peuvent induire l'expression d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales. Ainsi, dans les cellules épithéliales intestinales HT-29 clone 16E, le VIP induit l'expression et la sécrétion d'IL-8 par une voie dépendante des MAP kinases p38 et ERK1/2 (Toumi et coll., 2004). La neurotensine induit également la sécrétion d'IL-8 par les colonocytes humains (lignée NCM460 non transformées) par une voie Rho kinase dépendante de NF- $\kappa$ B (Zhao et coll., 2003a). Cependant le rôle de cette sécrétion d'IL-8, pro-inflammatoire ou réparateur, n'est pas connu.

### 3.1.2.3- Production de cytokines par les neurones entériques

Des études suggèrent que le rôle immunomodulateur du SNE pourrait également passer par la production de cytokines/chimiokines par les neurones. Suite à l'inflammation de la muqueuse par *Trichinella Spiralis* chez le rat, une augmentation de l'expression des ARNm et de la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et -1 $\beta$ , et d'IL-6 a été observée dans des préparations de muscle longitudinal-plexus myentérique (Khan et Collins, 1994). Cependant cette étude n'a pas permis d'identifier la ou les source(s) cellulaire(s) impliquée(s) dans la sécrétion de ces cytokines. Ces dernières peuvent en effet être sécrétées par des cellules musculaires, des cellules immunitaires, de la glie ou des neurones. Une étude a également montré l'expression du TGF $\beta$  dans le plexus myentérique d'estomac de rat (Hoffmann et coll., 1997). L'expression d'IFN $\gamma$  a également été détectée dans des terminaisons nerveuses situées le long de l'intestin chez le rat (Ljungdahl et coll., 1989). Néanmoins, ces études n'ont pas non plus permis d'identifier, de la glie ou des neurones, quel type cellulaire est impliqué dans l'expression de ces cytokines. Une étude préliminaire récente a cependant montré que des neurones myentériques d'estomac de rat sont immunoréactifs pour l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, aussi bien en situation basale que suite à l'inflammation induite par le LPS (Schicho et coll., 2003).

L'inflammation intestinale pourrait donc être en partie orchestrée par des composantes du SNE. Cependant, une fois l'inflammation installée, le SNE subit lui-même des altérations, liées notamment à la sécrétion de médiateurs inflammatoires dans son voisinage. Ces altérations du SNE pourraient être à l'origine de certains troubles fonctionnels rencontrés au cours de pathologies inflammatoires intestinales.

### **3.2- Altérations du SNE induites par l'inflammation**

Les altérations recensées au cours de l'inflammation sont multiples. Il s'agit d'altérations anatomiques des ganglions, de modifications du codage neurochimique et de la sur-excitabilité électrique des neurones.

#### **3.2.1- Altérations anatomiques**

Les modifications de l'architecture des ganglions et de l'innervation concernent principalement des altérations de la structure, telle que l'hyperplasie ou l'hypertrophie (Geboes et Collins, 1998), et la formation d'infiltrats inflammatoires au sein des ganglions, également appelé neuropathies inflammatoires (De Giorgio et coll., 2004).

##### *3.2.1.1- Altérations structurales des plexus*

Une multitude d'études histologiques ont montré des anomalies de la structure des plexus et des cellules du SNE au cours des MICI chez l'homme. Il s'agit notamment d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des nerfs, et des composants des ganglions. Au cours de la maladie de Crohn, une hypertrophie des nerfs et une augmentation de la taille des nerfs ont souvent été rapportées dans les régions inflammatoires (pour revue voir Geboes et Collins, 1998). L'épaississement des nerfs a plutôt été observé dans la sous-muqueuse, mais est également présent dans la muqueuse et le plexus myentérique. Cet épaississement a, en particulier, été décrit dans l'iléon et le côlon de patients atteints de la maladie de Crohn grâce à une étude histologique et immunohistochimique, utilisant des anticorps dirigés contre les neurofilaments (Belai et coll., 1997). Une hyperplasie des nerfs est également souvent

observée au cours de la maladie de Crohn (pour revue voir Geboes et Collins, 1998). En particulier, une étude a montré l'existence d'une hyperplasie des nerfs dans l'iléon et le côlon de patients atteints de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique. L'hyperplasie paraît plus profonde pour la maladie de Crohn (Lindgren et coll., 1993). Elle est associée à une augmentation de l'expression de récepteurs au NGF au cours de la maladie de Crohn dans les neurones, la glie et les cellules T (Von Herbay et coll., 1993). Au cours des MICI, une hypertrophie des neurones et des dommages neuronaux ont de plus été observés. Une augmentation du nombre de cellules à l'intérieur des ganglions sous-muqueux a également été rapportée, mais sans pouvoir identifier s'il s'agissait des neurones ou de la glie (pour revue voir Geboes et Collins, 1998). Ces différentes anomalies morphologiques observées au cours de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique sont résumées dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Principales anomalies morphologiques du SNE observées au cours des MICI chez l'homme.** (d'après Geboes et Collins, 1998)

Critère	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
<u>Fibres nerveuses</u>		
Hypertrophie (muqueuse, sous-muqueuse)	+++	-
Hyperplasie	++	+
Dommage axonal	++	+
<u>Corps cellulaire neuronal</u>		
Normal		
Hypertrophie	++	+
Hyperplasie	++	+
Dommage	++	+
<u>Cellules gliales</u>		
Hyperplasie	++	?

L'étude des modèles inflammatoires murins a surtout révélé une baisse du nombre de neurones au sein des ganglions. Dans le modèle DNBS chez le rat, une baisse significative du nombre de neurones dans les régions inflammatoires a été observée dès 24h. Au bout de 4 à 6 jours d'inflammation, l'effectif des neurones est diminué de 50%. Dans le plexus sous-muqueux, le nombre de ganglions est également diminué, contrairement au plexus myentérique (Sanovic et coll., 1999). Le mécanisme lié à cette perte neuronale serait l'apoptose et est bloqué par du sérum anti-neutrophiles (Boyer et coll., 2005). Au cours de l'infection par *Shistosoma Mansoni*, une atteinte des ganglions a également été observée, s'accompagnant parfois de cellules apoptotiques à l'intérieur des ganglions (Bogers et coll., 2000).

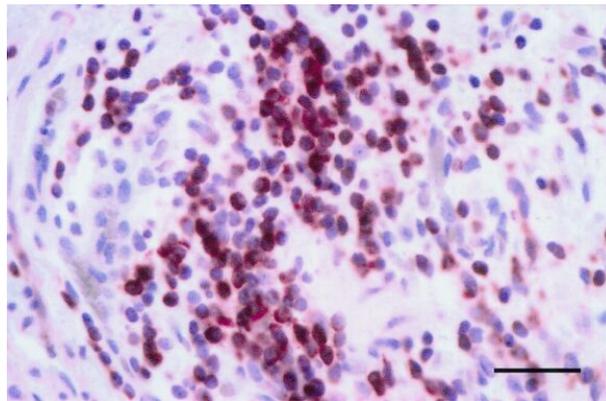
De plus en plus d'arguments montre que la glie est également une cible lors de l'inflammation intestinale. Chez des patients atteints d'entérocolite nécrosante néonatale, une diminution du nombre de cellules gliales adjacentes aux nerfs lésés a été observée (Wedel et coll., 1998). De même, une perte d'expression de GFAP a été observée dans des biopsies de patients atteints de la maladie de Crohn (Cornet et coll., 2001). En revanche, Au cours de l'inflammation induite par le TNBS chez le cobaye, une prolifération cellulaire a été observée au sein du plexus myentérique. Il s'agissait de la prolifération des cellules gliales (S-100 $\beta$  positives) et non des neurones (Bradley et coll., 1997). De plus, la glie entérique semble être la cible de médiateurs pro-inflammatoires car une étude récente a montré que l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et le LPS sont responsables de l'augmentation du nombre de cellules gliales GFAP positives, en culture et sur des préparation tissulaires. L'IL-1 $\beta$  induit de plus le taux intracellulaire de GFAP dans des cellules gliales en culture (Von Boyer et coll., 2004).

### 3.2.1.2- *Les neuropathies inflammatoires entériques*

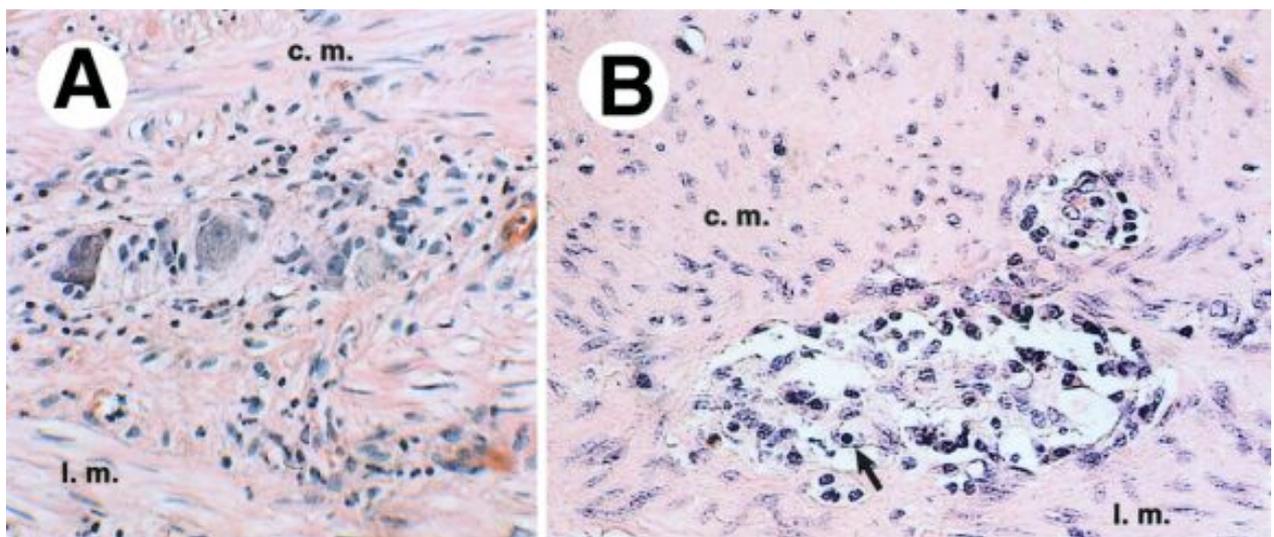
Il existe différentes formes de neuropathies entériques affectant le SNE (pour revue voir De Giorgio et Camilleri, 2004). La forme la plus connue et la plus extrême est la maladie de Hirschsprung, caractérisée par une absence totale de ganglion entérique. Parmi ces neuropathies, une forme suscite de plus en plus d'intérêt : les neuropathies inflammatoires.

Les neuropathies inflammatoires, caractérisées par l'infiltration au sein du plexus myentérique de cellules immunitaires composés de lymphocytes, peuvent être trouvées au cours ou suite à différentes pathologies, comme les syndromes paranéoplasiques, les infections, les maladies neurologiques, l'achalasie, les collagénoses, ou les MICI (pour revue voir De Giorgio et coll., 2004). La présence de l'infiltrat inflammatoire peut être à l'origine d'une altération de la fonctionnalité du SNE et conduire à un dysfonctionnement de la motricité digestive. Selon la portion du tube digestif atteinte, les manifestations cliniques peuvent être une défaillance du sphincter du bas œsophage (Goldblum et coll., 1996 ; Goldblum et coll., 1994), une gastroparésie (pour revue voir Camilleri, 2002), des vomissements (De Giorgio et coll., 2000a), une pseudoobstruction intestinale (Stanghellini et coll., 1988) ou un mégacôlon (De Giorgio et coll., 2002). Une étude récente a permis de plus de suggérer la présence de neuropathie inflammatoire au niveau du plexus myentérique dans l'intestin grêle de patients atteints de formes sévères du syndrome de l'intestin irritable (Tornblom et coll., 2002).

L'infiltrat inflammatoire est composé de lymphocytes CD-3 positifs (figure 21). Des études récentes ont montré de plus que les lymphocytes formant l'infiltrat inflammatoire étaient soit CD-4 positifs (phénotype de lymphocytes T-helper) soit CD-8 positifs (phénotype de lymphocytes cytotoxiques) (De Giorgio et coll., 2000a ; De Giorgio et coll., 2002 ; Smith et coll., 1997 ; De Giorgio et coll., 2000b ; Clark et coll., 2000). La présence de lymphocytes



**Figure 21 : Accumulation de lymphocytes CD3+ au sein du plexus myentérique du côlon gauche d'une femme de 55 ans présentant un mégacôlon idiopathique. Echelle : 25  $\mu$ m. (De Giorgio et coll., 2004)**



**Figure 22 : Coupe d'iléon d'un patient de 20 ans atteint de pseudo-obstruction intestinale chronique. La photo A (x200) a été prise quelques années avant la photo B (x250). Les deux photos montrent une importante infiltration de lymphocytes qui peut conduire à une baisse du nombre de neurones myentérique (B). (De Giorgio et coll., 2002).**

B et de monocytes a également été détectée dans les infiltrats inflammatoires situés au sein du plexus myentérique. Schappi et coll. (2003) ont également rapporté que l'infiltrat inflammatoire du plexus myentérique de trois enfants atteints d'obstruction intestinale fonctionnelle était composé uniquement d'éosinophiles. Chez l'un de ces patients, les auteurs ont détecté l'expression d'IL-5, un puissant chimioattractant d'éosinophiles, dans les neurones du plexus myentérique par immunohistochimie. (Schappi et coll., 2003).

L'infiltrat inflammatoire touche principalement le plexus myentérique mais peut également être présent dans le plexus sous-muqueux, dans de moindre mesures. La formation d'infiltrats est associée à une neurodégénérescence et peut parfois conduire à une complète disparition des neurones (figure 22) (De Giorgio et coll., 2002 ; Smith et coll., 1997 ; Tornblom et coll., 2002).

L'infiltrat est également caractérisé par une baisse de l'expression de différents marqueurs neuronaux, tels que la NSE, le VIP, la SP, le NPY, la NOS et le CGRP (De Giorgio et coll., 2000a ; De Giorgio et coll., 2002 ; Moses et coll., 2003).

Des observations similaires ont été réalisées dans des modèles animaux, inflammatoires ou infectieux. Chez des rats traités au DNBS, la colite induite s'accompagne d'une infiltration du plexus myentérique par des éosinophiles et des neutrophiles et d'une baisse du nombre de neurones par ganglion au cours du temps (Sanovic et coll., 1999). Chez des souris infectées par *Shistosoma mansoni*, la formation d'un infiltrat inflammatoire constitué de granulocytes et de lymphocytes a été identifiée au niveau du plexus myentérique autour des neurones, conduisant à un dysfonctionnement de la motricité intestinale (Bogers et coll., 2001). Enfin, chez le porc infecté par *Shistosoma japonicum*, une dégénérescence des neurones a été observée associée à des infiltrats inflammatoires composés d'éosinophiles, de mastocytes, de lymphocytes et de neutrophiles (Balemba et coll., 2001).

Au cours des neuropathies inflammatoires, une réponse immunitaire humorale est souvent associée à l'activation des lymphocytes (pour revue voir De Giorgio et coll., 2004). En effet, des anticorps circulants dirigés contre des marqueurs neuronaux ont été identifiés chez des patients atteints de syndrome paranéoplasique (Lennon et coll., 1991 ; King et coll., 1999). Différentes cibles moléculaires de ces anticorps antineuronaux ont été identifiées. Il s'agit notamment des anticorps anti-Hu (RNA binding protein Hu), anti-Yo (Purkinje cell protein Yo) et des anticorps dirigés contre les canaux calciques P/Q et N (pour revue voir De Giorgio et coll., 2004). Le plus étudié de ces anticorps est l'anticorps anti-Hu, qui est principalement retrouvé chez des patients atteints de syndrome paranéoplasique (Voltz et coll., 1997 ; Sutton et Winer, 2002). Les protéines Hu (HuC, HuD, HuR et Hel-N1) sont principalement exprimées dans le système nerveux central et les systèmes nerveux périphériques, à l'exception de HuR (Okano et Darnell, 1997 ; Wakamatsu et Weston, 1997 ; Lin et coll., 2002). Une étude récente a montré que l'exposition de cultures neuronales (neuroblastome SH-SY5Y et culture primaire de neurones myentériques) à du sérum de patient atteint d'un syndrome paranéoplasique contenant des anti-Hu activait des voies de signalisation proapoptotiques (caspase 3 et apaf-1). Ce résultat suggère donc que les anticorps anti-Hu seraient responsables de l'altération du SNE et des troubles de la motricité digestive observés chez des patients atteints de syndrome paranéoplasique (De Giorgio et coll., 2003).

Enfin, chez des patients atteints de ganglionite entérique idiopathique, l'expression de la chimiokine MIP-1 $\alpha$  a été détectée au sein de ganglions du plexus myentérique, dans des cellules immunitaires d'infiltrats inflammatoires, mais également dans des cellules gliales et dans des neurones. L'expression de chimiokines dans les ganglions pourrait être l'un des mécanismes possibles de la génération d'infiltrats inflammatoires dans les ganglions au cours des neuropathies inflammatoires (De Giorgio et coll., 2000).

### **3.2.2- L'inflammation intestinale modifie le contenu en neuromédiateurs des neurones**

L'étude du contenu en neuromédiateurs des nerfs et des neurones entériques par différentes techniques (immunohistochimie et tests radioimmunologiques) ont révélé l'existence d'altérations du phénotype neurochimique du SNE au cours de l'inflammation intestinale. Ces modifications concernent notamment l'expression du VIP et de la SP au cours des MICI et lors de processus infectieux.

Au cours de la maladie de Crohn, différentes études ont rapporté une augmentation de l'innervation VIPergique, une augmentation du nombre de neurones sous-muqueux et myentériques VIP-positifs ainsi qu'une concentration plus importante en VIP des tissus dans les zones inflammatoires (Bishop et coll., 1980 ; O'Morain et coll., 1984 ; Belai et coll., 1997 ; Schneider et coll., 2001). Des modifications similaires ont été notées dans des zones non inflammatoires, suggérant que les altérations du SNE ne sont pas localisées uniquement dans les zones inflammatoires mais qu'elles peuvent également atteindre les zones non inflammatoires (Schneider et coll., 2001 ; O'Morain et coll., 1984). Néanmoins, d'autres études ont décrit soit une diminution soit l'absence de changement de la concentration en VIP des tissus et/ou de l'innervation VIPergique au cours de la maladie de Crohn (Koch et coll., 1987 ; Sjolund et coll., 1983). Ceci peut être lié aux stades de la maladie auxquels les malades sont étudiés, aux traitements qu'ils reçoivent, ou à la méthodologie utilisée (étude sur coupe vs. étude sur paroi entière). La maladie de Crohn a également été associée à une augmentation de l'innervation et/ou du nombre de neurones immunoréactifs pour la Thyrosine hydroxylase, la sérotonine, la NOS et le neuropeptide Y dans le plexus myentérique de l'iléon (Belai et coll., 1997).

Au cours de la rectocolite hémorragique, les modifications observées concernent surtout la SP dans la sous-muqueuse, le plexus myentérique et le muscle longitudinal. Ainsi, différentes études ont décrit une augmentation du nombre de nerfs SP-positifs, de neurones myentériques SP-positifs ou de la concentration en SP des tissus (Watanabe et coll., 1998 ; Keranen et coll., 1995 ; Vento et coll., 2001 ; Neunlist et coll., 2003c). Cette altération du codage neurochimique a également été observée à distance de l'inflammation, dans des zones macroscopiquement non inflammatoires (Neunlist et coll., 2003c). D'autres études ont cependant rapporté soit une diminution soit l'absence de modification de la concentration des tissus en SP (Renzi et coll., 1998 ; Surrenti et coll., 1993). Comme précédemment, cette différence peut provenir du stade de la maladie, du traitement des patients ou de la méthodologie utilisée. La rectocolite hémorragique a aussi été associée à des modifications du contenu en VIP (Tomita et coll., 2000).

Au cours de processus infectieux, des altérations du contenu en VIP et en SP ont également été rapportées. Ainsi, une altération de l'innervation VIP ou SP positive a été observée chez des souris infectées par *Shistosoma mansoni* (Varilek et coll., 1991) et chez des porcs infectés par *Shistosoma japonicum* (Balemba et coll., 2001). Au cours de l'infection par *Trischinella spiralis*, une augmentation de la quantité de SP a également été observée dans le plexus myentérique (Swain et coll., 1992). L'IL-1 $\beta$  serait responsable de la régulation de la synthèse de la SP dans ce modèle (Hurst et coll., 1993).

### **3.2.3- L'inflammation intestinale entraîne une sur-excitabilité des neurones entériques**

Le comportement électrophysiologique des neurones entériques au cours de l'inflammation, qui se traduit par des modifications rapides de la libération de

neuromédiateurs, est l'un des paramètres les plus étudiés dans le domaine de la neurogastroentérologie. Ces études ont surtout été réalisées chez le cobaye, qui est le modèle le plus utilisé pour caractériser les modifications électriques du SNE au cours de l'inflammation. Ces différentes études sont récapitulées dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Tableau récapitulatif des stimuli augmentant l'excitabilité des neurones entériques.** Les références de ces études sont mentionnées dans le texte.

Stimulus inflammatoire	Neurone cible	Modification
<u>Modèles animaux des MICI</u>		
TNBS (cobaye)	Myentériques (AH) Sous-muqueux (AH)	Hyperexcitabilité Hyperexcitabilité
<u>Maladies infectieuses</u>		
<i>Trichinella spiralis</i> (cobaye)	Myentériques (AH) Sous-muqueux	Hyperexcitabilité Hyperexcitabilité
Toxine A du <i>C. difficile</i> (cobaye)	Sous-muqueux	Hyperexcitabilité
<u>Médiateurs inflammatoires</u>		
IL-1 $\beta$ (homme, cobaye)	Sous-muqueux, myentériques	Hyperexcitabilité
IL-6 (cobaye)	Sous-muqueux, myentériques	Hyperexcitabilité
TNF $\alpha$ (rat)	Myentériques	Hyperexcitabilité
PGE <sub>2</sub> (rat)	Myentériques (AH, S)	Hyperexcitabilité
PGD <sub>2</sub> (cobaye)	Sous-muqueux	Hyperexcitabilité
Tryptase (cobaye)	Sous-muqueux	Hyperexcitabilité

Plusieurs études *in vivo* menées chez l'animal ont montré que l'inflammation s'accompagne d'une hyperexcitabilité des neurones entériques, car la décharge de potentiels d'action est plus grande, tout comme la survenue de l'activité électrique spontanée. Au cours de l'infection par *Trichinella spiralis* chez le cobaye, Palmer et coll. (1998) ont noté une augmentation de l'excitabilité des neurones myentériques AH du jéjunum 3, 6 et 10 jours après infection par rapport aux animaux non infectés. Chez des cobayes sensibilisés à *T. spiralis*, l'exposition à des antigènes de ce parasite augmente l'excitabilité des neurones sous-muqueux coliques (Frieling et coll., 1994). Xia et coll., (2000) ont montré que la toxine A du *C. difficile* altère le comportement électrophysiologique (dépolariation et augmentation de l'excitabilité) et les neurotransmissions adrénégiques inhibitrices provenant des fibres postganglionnaires, en les supprimant. Il s'agit d'un effet direct sur les neurones car il n'est bloqué ni par la TTX et ni par un antagoniste du récepteur à l'histamine, impliquant les mastocytes. Cependant les mastocytes ont largement été impliqués dans l'hyperexcitabilité des neurones au cours d'états infectieux. Reed et coll. (2003) ont en effet montré que les tryptases des mastocytes et PAR-2 induisent l'hyperexcitabilité de neurones sous-muqueux chez le cobaye. Dans des modèles inflammatoires chroniques, l'hyperexcitabilité des neurones a également été mise en évidence. Chez des cobayes traités au TNBS, l'inflammation s'accompagne d'une augmentation de l'excitabilité des neurones myentériques coliques de type AH (Linden et coll., 2003). Dans ce même modèle inflammatoire, les neurones sous-muqueux AH sont plus excitable et la transmission synaptique est facilitée, par un mécanisme pré-synaptique impliquant les récepteurs P2X et 5-HT(3) côté post-synaptique (Lomax et coll., 2005).

Chez l'homme, une étude réalisée en culture d'organe, a montré que lors de l'infection par la toxine B du *C. difficile*, une population de neurones sous-muqueux coliques VIP-positifs sont activés par l'IL-1 $\beta$ , qui a un effet excitateur direct sur le potentiel membranaire

(Neunlist et coll., 2003b). Les médiateurs inflammatoires sont en effet impliqués dans l'augmentation de l'excitabilité des neurones entériques. L'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, à des doses nanomolaires, augmentent l'excitabilité des neurones sous-muqueux intestinaux du cobaye, caractérisée par la dépolarisation du potentiel membranaire, la diminution de la conductance membranaire et l'augmentation de la décharge en potentiels d'action. Cette étude montre de plus que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 suppriment les PPSE et les PPSI. Ces deux cytokines conduiraient donc à la suppression de l'activité inhibitrice de la noradrénaline sur les neurones sécrétomoteurs, ce qui pourrait contribuer aux diarrhées sécrétoires (Xia et coll., 1999). L'effet excitateur de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 a été reproduit par Kelles et coll. (2000) sur des neurones myentériques d'iléon de cobaye, immunoréactifs pour la NOS et l'acétylcholine. Cette étude a également montré le blocage de la neurotransmission cholinergique par l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6. Le TNF $\alpha$  diminue quant à lui le potentiel membranaire des neurones myentériques de rat et potentialise la dépolarisation induite par le carbachol (Rehn et coll., 2004). Les prostaglandines ont également été impliquées dans l'augmentation de l'excitabilité des neurones entériques. PGE<sub>2</sub> augmente l'excitabilité des neurones AH et S du plexus myentérique de l'iléon de rat (Dekkers et coll., 1997). Chez le cobaye, PGE<sub>2</sub> dépolarise les neurones myentériques AH et S et augmente l'excitabilité des neurones. Cet effet est bloqué par la TTX et un antagoniste des récepteurs à la SP (Manning et coll., 2002). De même PGD<sub>2</sub> active les neurones cholinergiques sous-muqueux coliques de cobaye (Frieling et coll., 1994b). Linden et coll. (2004) ont de plus montré que Cox-2 contribue à l'augmentation de l'excitabilité des neurones myentériques AH, associée aux troubles de la motricité, observée au cours de l'inflammation induite au TNBS chez le cobaye.

L'étude des modèles animaux a de plus révélé que l'inflammation s'accompagne, outre de l'activation électrique des neurones, de l'induction de l'activité transcriptionnelle. Ainsi, pendant l'infection du jéjunum de cobaye par *T. spiralis*, la surexcitabilité des neurones

s'accompagne d'une augmentation de l'expression de c-fos, en particulier dans les neurones Calbindin positifs (Palmer et coll., 1998). De même, Tjwa et coll (2003), ont montré que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression du proto-oncogène c-fos, marqueur d'activation neuronale, par une voie dépendante de Cox-2 dans les neurones et la glie, dans l'iléon et le côlon de cobaye. Les neurones ainsi activés sont plutôt de phénotype NOS dans le plexus myentérique et plutôt de phénotype VIP dans le plexus sous-muqueux.

### **3.3- Troubles fonctionnels liés au SNE au cours de l'inflammation intestinale**

L'inflammation intestinale, quelle qu'en soit l'origine, entraîne la plupart du temps des anomalies fonctionnelles. De telles anomalies ont été rapportées chez l'homme et dans les modèles animaux, et concernent des modifications de la motricité digestive et de la sécrétion d'électrolytes. L'objectif de ce chapitre n'est pas de faire une revue exhaustive des altérations de la motricité et de la sécrétion observées au cours des pathologies inflammatoires humaines ou dans les modèles animaux, mais de montrer, par quelques exemples, que des altérations de la motricité ou de la sécrétion ont lieu au cours de l'inflammation et qu'une composante nerveuse pourrait en être en partie responsable. En effet, l'action directe de médiateurs inflammatoires sur le muscle ou les cellules épithéliales sécrétrices a été bien documentée et ne sera pas développée ici (pour revue voir Mawe et coll., 2004).

#### **3.3.1- Altérations de la motricité du tube digestif au cours de l'inflammation**

Un nombre croissant d'études suggère que dès la première étape d'initiation des réflexes neuronaux, soit la libération de la sérotonine par les cellules entérochromaffines et sa

fixation sur ces récepteurs présents sur les projections des IPAN, l'inflammation génère des modifications qui contribuent à l'altération des fonctions régulées par le SNE. Ainsi, lors de l'inflammation causée par *Campylobacter enteritis* ou le DSS, une hyperplasie des cellules entérochromaffines a été observée (Spiller et coll., 2000 ; Oshima et coll., 1999). De même, après 6 jours d'inflammation causée par le TNBS chez le cobaye, une augmentation du nombre de cellules entérochromaffines et de la libération de sérotonine a été rapportée (Linden et coll., 2003a). Cette étude a de plus montré que l'expression de la protéine et des ARNm du transporteur SERT est diminuée dans les entérocytes de cobaye traité au TNBS, ce qui augmente d'autant plus la disponibilité de la sérotonine au voisinage des terminaisons nerveuses.

Des études ont en effet suggéré l'implication des voies nerveuses sensorielles extrinsèques dans les troubles de la motricité observées au cours de l'inflammation. Ainsi, Shea-Donohue et coll. (1997) ont montré, par une étude utilisant la capsaïcine dans un modèle de lapin traité à la ricine, l'implication des afférences sensibles dans l'altération de la motricité *via* la libération de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines et les leucotriènes. Une étude a de plus montré que les troubles de la motricité induits par l'irradiation chez le rat dépendent de la SP libérée par les afférences primaires sensibles, sensibles à la capsaïcine (Linard et coll., 2003).

Chez l'homme, Tomita et coll. (1998) ont montré que les altérations de la motricité colique observées chez des patients atteints de rectocolite hémorragique seraient dues à l'innervation inhibitrice non-cholinergique et non-adrénergique, innervation qui serait plus importante chez ces patients. Dans la maladie de Crohn, Koch et coll. (1990) ont montré que la neurotransmission vers le muscle circulaire est altérée, associée à une baisse de la disponibilité en VIP.

L'étude des modèles inflammatoires animaux (lapins traités à la ricine et rats traités au TNBS) a montré que l'inflammation augmente l'excitation des voies non-cholinergiques et résulte d'une augmentation de la réponse contractile induite par la SP (Goldhill et coll., 1995 ; Hosseini et coll., 1999). De plus, les altérations de la motricité ne sont pas limitées aux zones inflammatoires. En effet, Moreels et coll (2001) ont observé que, suite à une iléite induite au TNBS chez le rat, la réponse contractile de l'estomac est diminuée et la relaxation du muscle longitudinale est altérée à cause d'une inhibition de la neurotransmission non adrénérique et non cholinergique inhibitrice. Dans ce même modèle, Poli et coll. (2001) ont noté une diminution de la libération d'ACh et de la réponse contractile induite par la stimulation de l'innervation entérique, tandis que la réponse contractile induite par l'apport exogène d'ACh est augmentée. Cette étude suggère donc que les troubles de la motricité, dans ce modèle, dérivent d'une altération de l'innervation cholinergique du plexus myentérique induite par le TNBS, et non de la réponse du muscle.

Dans les modèles infectieux, tels que ceux générés par les Helminthes chez la souris, il existe une hypercontractilité musculaire (Zhao et coll., 2003b ; Akiho et coll., 2002). De même, après l'infection des souris par *Shistosoma mansoni*, une augmentation de la réponse contractile de l'iléon a été observée (Bogers et coll., 2000). Ces effets seraient cependant dus à une augmentation de la réponse du myocyte aux neurotransmetteurs.

Les cellules immunitaires ont largement été impliquées dans l'altération des fonctions motrices, telles que les lymphocytes T, les mastocytes, les macrophages, les neutrophiles, les monocytes et les éosinophiles (pour revue voir Collins, 1996). En particulier, une étude a montré que les macrophages sont impliqués dans l'altération de la voie cholinergique chez la souris infectée par *T. spiralis* (Galeazzi et coll., 2000). De plus, un nombre croissant d'éléments montre le rôle clé joué par les mastocytes dans le contrôle neuronal de ces altérations (Collins, 1996). Les médiateurs inflammatoires, sécrétés par les cellules

immunitaires au cours de l'inflammation, ont également été impliqués dans les altérations de la motricité liées à l'inflammation (Morteau et coll., 1993 ; Zhao et coll., 2003b ; Akiho et coll., 2002). En particulier, l'IL-1 $\beta$  diminue la réponse contractile induite par l'acétylcholine dans le jéjunum par une voie dépendante du VIP (Aube et coll., 2001).

### **3.3.2- Altérations de la sécrétion du tube digestif au cours de l'inflammation**

Des troubles du transport d'électrolytes, liés à des altérations des voies neuronales, ont également été rapportés au cours de l'inflammation. Comme décrit précédemment, la capsaïcine et la dénervation extrinsèque chirurgicale bloquent les effets pro-sécrétoires induits par la toxine A du *C. difficile* (Castagliuolo et coll., 1994 ; Mantyh et coll., 2000). Des études récentes ont de plus montré l'implication du SNE dans le contrôle de la sécrétion d'électrolytes au cours de l'inflammation. Dans un modèle de colite induite par le TNBS chez le rat, Sanchez de Medina et coll. (2002) ont montré que l'inflammation inhibe la réponse sécrétoire induite par le carbachol, effet aboli après ablation de la sous-muqueuse ou après l'utilisation de la TTX. De même, l'inflammation, induite par le DSS chez la souris, inhibe la sécrétion d'électrolytes induite par le carbachol, ce qui est sensible à la TTX (Sayer et coll., 2002). Cet effet n'est pas bloqué par l'atropine mais par l'héxaméthonium, suggérant l'implication des voies cholinergiques nicotinerigiques.

## SYNTHESE

Un nombre croissant de travaux suggère l'existence d'interactions bidirectionnelles entre la barrière épithéliale intestinale et le système nerveux entérique. Ces études ont, en particulier, étudié le rôle des cellules entérochromaffines sur l'activité du SNE (Sharkey et Mawe, 2002), ou caractérisé le rôle du SNE sur des grandes fonctions physiologiques de la barrière épithéliale intestinale, telles que la sécrétion d'électrolytes (Weber et coll., 2001), la prolifération ou la perméabilité (Neunlist et coll., 2003a ; Hällgren et coll., 1998 ; Bjerknes et Cheng, 2001). Cependant, l'existence d'interactions entre la barrière épithéliale intestinale et le SNE, chez l'homme, au cours de processus inflammatoires, est peu décrite. En particulier, l'hypothèse d'interactions entre des constituants de la muqueuse et le SNE modulant la réponse inflammatoire a peut-être été avancée mais n'a jamais été prouvée.

Au cours de pathologies inflammatoires intestinales, d'origine infectieuse ou chronique, de nombreuses études ont identifié le SNE comme étant l'une des cibles de l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires, sécrétés par les cellules immunitaires au cours de l'inflammation, sont en effet capables de modifier le comportement électrophysiologique et le phénotype neurochimique des neurones (Neunlist et coll., 2003b ; Linden et coll., 2003 ; Xia et coll., 1999 ; Schemann et Neunlist, 2004). Dans certains cas, ces médiateurs peuvent également induire la mort des neurones (De Giorgio et coll., 2004b). De manière plus surprenante, des études récentes suggèrent que des composants du SNE peuvent eux-même synthétiser et sécréter des cytokines/chimiokines lors de processus inflammatoires. La glie, en particulier, est capable de sécréter de l'IL-6 (Ruhl et coll., 2001). Des résultats préliminaires suggèrent également que des neurones myentériques humains expriment MIP-1 $\alpha$  (De Giorgio et coll., 2000c). Cependant, la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8, une chimiokine clé de la réponse inflammatoire intestinale, n'a, à notre connaissance,

jamais été rapportée. De plus, le rôle de la production de chimiokines par les neurones n'a, à ce jour, pas été identifié. Un rôle potentiel de la sécrétion de chimiokines par les neurones entériques pourrait être la formation d'infiltrats inflammatoires au sein des ganglions myentériques et sous-muqueux, tels ceux dont la présence a été rapportée dans différentes pathologies inflammatoires intestinales (De Giorgio et coll., 2004b).

**- OBJECTIFS DE L'ETUDE ET  
RESULTATS -**

## OBJECTIFS

**Au regard des questions soulevées par l'étude de la bibliographie, les objectifs de ce travail de thèse étaient :**

- (1) d'apporter des preuves directes de l'existence d'interactions entre la barrière épithéliale intestinale et le SNE chez l'homme au cours de processus inflammatoires
- (2) de déterminer la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8 en conditions inflammatoires
- (3) d'identifier les médiateurs et les voies de signalisation impliqués dans la régulation de la production d'IL-8 par les neurones
- (4) de montrer la capacité des neurones à induire une réponse chimiotactique des cellules immunitaires humaines via la production d'IL-8.

Ce travail de thèse est présenté ici sous forme de trois articles (un sous presse, un soumis et un en cours de préparation). Le premier article entreprend de montrer l'existence d'interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine régulant la sécrétion d'IL-8, en l'absence et en la présence d'un stimulus inflammatoire de la muqueuse généré par la toxine B du *C. difficile*, et d'en identifier le(s) médiateur(s) impliqué(s). Cette étude vise de plus à déterminer la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8 au cours de l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*, et d'en étudier le(s) médiateur(s) et le(s) voie(s) de signalisation impliqués. Dans le deuxième article, nous nous proposons d'étudier l'implication d'interactions neuro-épithéliales dans la régulation de la sécrétion et de l'expression des ARNm de l'IL-8 dans les neurones, et d'en identifier le(s) médiateur(s) impliqué(s). De plus, cette étude vise à rechercher un rôle fonctionnel potentiel de la sécrétion de chimiokines par les neurones. La troisième étude a pour objectif d'étudier la

régulation de l'expression d'une autre chimiokine, MIP-1 $\beta$ , dans les neurones par des interactions neuro-épithéliales. Ces trois études sont présentées successivement et sont suivies de résultats complémentaires qui leurs sont associés. Enfin, l'ensemble de ces résultats sera discuté dans un chapitre commun.

## **- ARTICLE 1 -**

**Mise en évidence d'interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine au cours de processus inflammatoires intestinaux : implication du système nerveux entérique dans la sécrétion d'IL-8.**

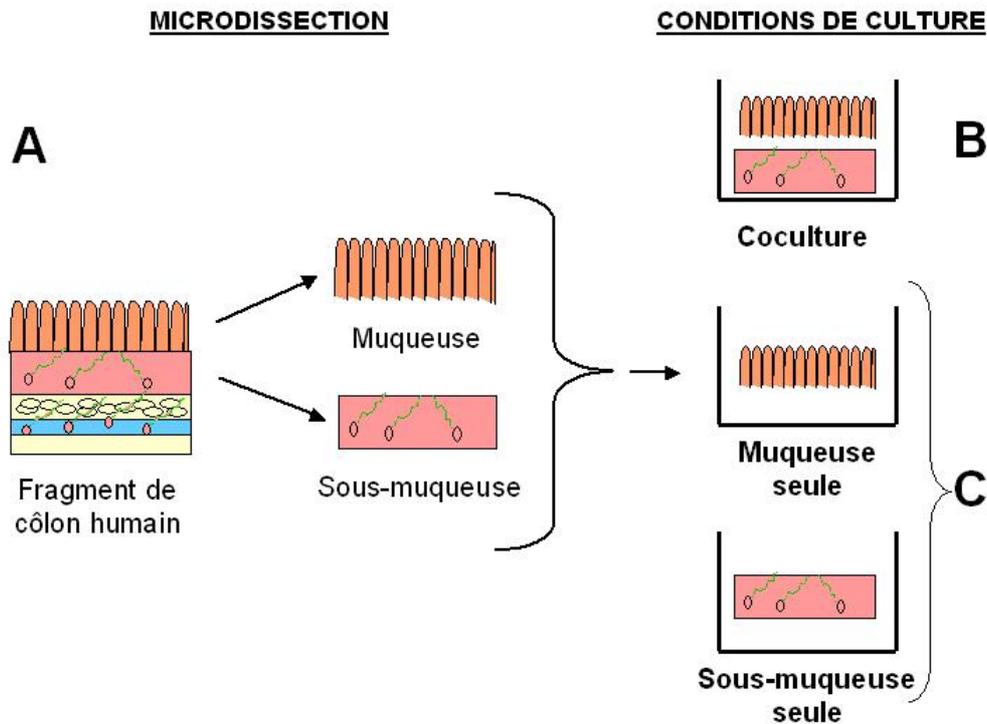
## **I- Mise en évidence d'interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine au cours de processus inflammatoires intestinaux : implication du système nerveux entérique dans la sécrétion d'IL-8.**

L'infection par les toxines du *C. difficile* génère une inflammation sévère caractérisée par la sécrétion d'IL-8 et l'infiltration de neutrophiles vers le site de l'inflammation, dont la première cible est la muqueuse intestinale (Pothoulakis et Lamont, 2001). Le plexus de Meissner, situé dans la sous-muqueuse chez l'homme, a également été récemment identifié comme une autre cible de la toxine B du *C. difficile* (Neunlist et coll., 2003b). Néanmoins l'implication d'interactions entre ces différents compartiments du tube digestif, soit la muqueuse et la sous-muqueuse humaine, dans la régulation de la sécrétion d'IL-8 au cours de l'infection par le *C. difficile* est inconnue.

Par ailleurs, des études ont suggéré que le SNE pouvait être une source de médiateurs inflammatoires. En effet, les cellules gliales entériques sont capables de sécréter *in vitro* de l'IL-6 en réponse à une exposition à l'IL-1 $\beta$  (Ruhl et coll., 2001) et une étude préliminaire a montré que certains neurones myentériques sont immunoréactifs pour MIP-1 $\alpha$  chez des patients atteints de pseudo-obstruction intestinale chronique (De Giorgio et coll., 2000c). Cependant l'implication directe des neurones entériques dans la production de chimiokines, telles que l'IL-8, au cours de l'infection par le *C. difficile* chez l'homme est inconnue. Les médiateurs et les voies de signalisation impliqués dans la sécrétion d'IL-8 par les neurones humains n'ont également jamais été décrits.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle de coculture organotypique, composé de muqueuse et de sous-muqueuse humaine, dans le but d'identifier de potentielles interactions entre ces deux composantes, en situation contrôle et suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile* (10 ng/mL). A partir de pièces de résection chirurgicale de patients opérés pour cancer, nous avons microdisséqué la muqueuse d'une part

et la sous-muqueuse contenant le plexus de Meissner, d'autre part (figure 23A). Ces deux composantes étaient soit placées en coculture (figure 23B) soit cultivées seules (figure 23C).



**Figure 23. Modèle d'étude des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales humaines.**

Ce modèle permet (1) de préserver un niveau d'organisation intégré à l'intérieur de la muqueuse et de la sous-muqueuse, (2) de traiter l'une des composantes indépendamment de l'autre, en particulier de générer spécifiquement l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile* et (3) d'étudier l'implication de facteurs diffusibles dans les interactions muqueuse/sous-muqueuse. Afin d'identifier des interactions potentielles entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine, nous avons comparé la sécrétion d'IL-8 obtenue en coculture avec la somme des sécrétions d'IL-8 des deux composantes cultivées seules (figure 23B-C), en situation contrôle et suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*. L'utilisation de ce modèle a montré que, en situation contrôle, la sécrétion d'IL-8 en coculture

était plus faible que la somme des sécrétions d'IL-8 des deux composantes cultivées seules. En revanche, suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*, la sécrétion d'IL-8 en coculture était supérieure à la somme des sécrétions d'IL-8 de la muqueuse prétraitée avec la toxine B du *C. difficile* et de la sous-muqueuse cultivées seules.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché le(s) médiateur(s) impliqué(s) dans l'induction de la sécrétion d'IL-8 en coculture suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*. Une étude réalisée précédemment au laboratoire avait montré que les effets de la toxine B du *C. difficile* sur l'activation des neurones sous-muqueux humains étaient médiés par l'IL-1 $\beta$ . L'utilisation d'IL-1ra (10 ng/mL) ou d'un anticorps neutralisant anti-IL-1 $\beta$  (1/200<sup>e</sup>) a permis de bloquer totalement l'augmentation d'IL-8 induite par la toxine B du *C. difficile* en coculture, montrant que cet effet est dépendant d'une voie passant par l'IL-1 $\beta$ .

Dans un troisième temps, nous avons cherché à déterminer la capacité des neurones sous-muqueux humains à produire de l'IL-8 au cours de l'infection par la toxine B du *C. difficile*. Grâce à une étude immunohistochimique, nous avons montré que la toxine B du *C. difficile* augmente l'immunoréactivité pour l'IL-8 dans les neurones entériques sous-muqueux humains aussi bien en coculture que dans une préparation intacte de muqueuse et de sous-muqueuse. Cet effet est bloqué par l'IL-1ra et reproduit par l'IL-1 $\beta$  humaine recombinante (10 ng/mL), suggérant l'implication de l'IL-1 $\beta$  dans l'augmentation de l'immunoréactivité de l'IL-8 dans les neurones induite par la toxine B du *C. difficile*. L'expression de l'IL-8 a également été détectée dans les cellules gliales entériques du plexus sous-muqueux.

Enfin, nous avons recherché les voies de signalisation impliquées dans l'induction de la production d'IL-8 par les neurones en réponse à l'IL-1 $\beta$ . Du fait de l'absence d'une méthode d'isolement et de maintien en culture de neurones entériques humains, nous avons utilisé deux lignées neuronales humaines différenciées : NT2-N et SH-SY5Y. Dans ces deux

lignées, nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  régule la sécrétion et l'expression des ARNm de l'IL-8. Nous avons testé l'implication des deux voies MAP kinases p38 et ERK1/2 dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par l'IL-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N, car ces deux voies interviennent dans la régulation de ce gène dans de multiples types cellulaires (Hoffmann, 2002). Par western blot, nous avons tout d'abord mis en évidence la phosphorylation de p38 et de ERK1/2 30 minutes après le traitement des neurones NT2-N avec l'IL-1 $\beta$ . De plus, le prétraitement des NT2-N avec des inhibiteurs spécifiques de p38 ou de ERK1/2 avant l'ajout d'IL-1 $\beta$  a permis de bloquer partiellement l'induction de la sécrétion et de l'expression des ARNm de l'IL-8 dans les NT2-N. Ces résultats démontrent le rôle de ces deux voies MAP kinases dans la régulation de la sécrétion et de l'expression des ARNm de l'IL-8 dans les NT2-N en réponse à l'IL-1 $\beta$ .

En conclusion, cette étude montre que (1) des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine modulent la sécrétion d'IL-8 en situation contrôle et suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*, (2) l'IL-1 $\beta$  est impliquée dans la régulation de la sécrétion d'IL-8 en coculture suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*, (3) les neurones sous-muqueux humains expriment de l'IL-8 au cours de l'infection par la toxine B du *C. difficile* par une voie dépendante de l'IL-1 $\beta$  et (4) les voies de signalisation MAP kinases p38 et ERK1/2 sont impliquées dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par l'IL-1 $\beta$  dans les neurones humains.

Cet article sera prochainement publié dans *Cellular Microbiology* ; 2005, 7(12), 1798-1810

# Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion

Emmanuelle Tixier,<sup>1,2</sup> Florent Lalanne,<sup>1</sup> Ingo Just,<sup>3</sup> Jean-Paul Galmiche<sup>1,2</sup> and Michel Neunlist<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U539, Hôpital Hôtel-Dieu, 44035 Nantes, France.*

<sup>2</sup>*Digestive Diseases Institute, Hôpital Hôtel-Dieu, 44035 Nantes, France.*

<sup>3</sup>*Department of Toxicology, Hannover Medical School, D-30623 Hannover, Germany.*

## Summary

Interleukin-8 (IL-8) is a key chemokine upregulated in various forms of intestinal inflammation, especially those induced by bacteria such as *Clostridium difficile* (*C. difficile*). Although interactions between different mucosal and submucosal cellular components have been reported, whether such interactions are involved in the regulation of IL-8 secretion during *C. difficile* infection is unknown. Moreover, whether the enteric nervous system, a major component of the submucosa, is involved in IL-8 secretion during an inflammatory challenge remains to be determined. In order to investigate mucosa/submucosa interactions that regulate IL-8 secretion, we co-cultured human intestinal mucosa and submucosa. In control condition, IL-8 secretion in co-culture was lower than the sum of the IL-8 secretion of both tissue layers cultured alone. Contrastingly, IL-8 secretion increased in co-culture after mucosal challenge with toxin B of *C. difficile* through an IL-1 $\beta$ -dependent pathway. Moreover, we observed that toxin B of *C. difficile* increased IL-8 immunoreactivity in submucosal enteric neurones in co-culture and in intact preparations of mucosa/submucosa, through an IL-1 $\beta$ -dependent pathway. IL-1 $\beta$  also increased IL-8 secretion and IL-8 mRNA expression in human neuronal cell lines (NT2-N and SH-SY5Y), through p38 and ERK1/2 MAP kinase-dependent pathways. Our results demonstrate that mucosa/submucosa interactions regulate IL-8 secretion during inflammatory processes in human through IL-1 $\beta$ -dependent pathways. Finally we ob-

served that human submucosal neurones synthesize IL-8, whose production in neurones is induced by IL-1 $\beta$  via MAPK-dependent pathways.

## Introduction

Intestinal inflammation is often characterized by an influx of inflammatory cells mediated by secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Interleukin-8 (IL-8) is one of the key chemokines responsible for the recruitment of neutrophils or T lymphocytes to the site of inflammation or infection (Baggiolini *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1989). *Clostridium difficile* (*C. difficile*) is one of the intestinal pathogens known to induce massive IL-8 production. *C. difficile* causes antibiotic-associated diarrhoea and pseudomembranous colitis in human, due to the secretion of two enterotoxins, toxin A (308 kDa) and toxin B (270 kDa) (Just and Gerhard, 2004). Both toxins increase IL-8 mRNA expression in a model of human intestinal xenograft in immunodeficient mice (Savidge *et al.*, 2003). Toxins of *C. difficile* also induce IL-8 expression in human monocytes and intestinal epithelial cells (Branka *et al.*, 1997; Linevsky *et al.*, 1997; Warny *et al.*, 2000). However, mediators and mechanisms responsible for the regulation of IL-8 secretion in response to mucosal challenge with toxin B of *C. difficile* are, in human, still unknown.

Intestinal inflammation is not only the result of the immune system's response to mucosal aggression by pathogens, but it is also thought to be the consequence of a complex interplay between immune and non-immune cells, including epithelial, muscle, and nerve cells (Fiocchi, 1997). It is however, currently unknown whether interactions between mucosal and submucosal components are involved in the regulation of IL-8 secretion in response to mucosal challenge with toxin B of *C. difficile*. Moreover, although components of the mucosa, such as epithelial cells, can respond to bacterial infections by secreting various cytokines/chemokines (Jung *et al.*, 1995; Branka *et al.*, 1997; Sansonetti *et al.*, 1999), it is yet to be determined, whether components of the submucosa, such as the enteric nervous system (ENS), are involved in the regulation of the inflammatory response.

The ENS is an integrative network composed of neurones and glial cells. It consists of two major plexus, the submucosal and the myenteric plexus (Wood, 1994).

Received 18 February, 2005; revised 3 June, 2005; accepted 6 June, 2005. \*For correspondence. E-mail michel.neunlist@univ-nantes.fr; Tel. (+33) 240 087515; Fax (+33) 240 087506.

There is mounting evidence that the ENS is involved in intestinal inflammatory processes. Indeed, alterations of excitability (Xia *et al.*, 1999; Linden *et al.*, 2004) and neurochemical content (Schemann and Neunlist, 2004) in enteric neurones have been shown in experimental models of intestinal inflammation. Furthermore, we previously demonstrated that toxin B of *C. difficile* activates VIPergic human submucosal neurones through an IL-1 $\beta$ -dependent pathway (Neunlist *et al.*, 2003a). In addition, *in vitro* studies in rat, revealed that elements of the longitudinal muscle-myenteric plexus secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 (Khan and Collins, 1994). However, the authors did not identify the cellular origin of these secretions, i.e. muscular, glial, or neuronal cells (Khan and Collins, 1994). IL-1 $\beta$  was nonetheless shown to increase IL-6 expression in enteric glial cells (Ruhl *et al.*, 2001), and a preliminary study suggests that human myenteric neurones can synthesize the chemokine MIP-1 $\alpha$  (De Giorgio *et al.*, 2000). It is, however, currently unknown whether components of the human ENS are able to secrete chemokines, such as IL-8, in response to inflammatory stimuli and if so, which mediators and intracellular pathways are involved.

Therefore, we developed a human co-culture model to identify potential interactions between the mucosa and the

submucosa regulating IL-8 secretion in response to a mucosal inflammatory challenge with toxin B of *C. difficile*. We also explored involvement of human enteric neurones in IL-8 production and identified the intracellular transduction pathways involved in IL-8 neuronal secretion using a cellular model.

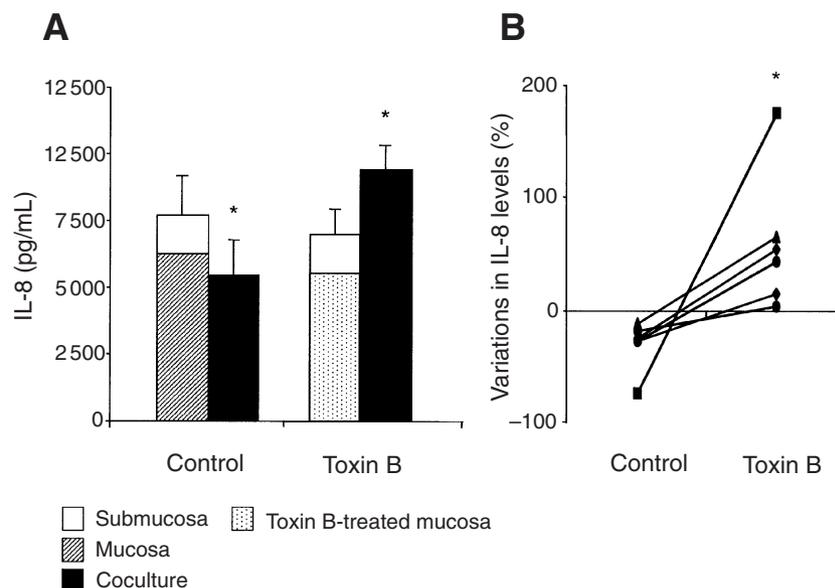
## Results

### Interleukin-8 secretion is lower in mucosa/submucosa co-culture

After 5 h of short-term organ culture, IL-8 secretion of mucosa and submucosa cultured alone was  $6277 \pm 1388$  pg ml $^{-1}$  and  $1479 \pm 301$  pg ml $^{-1}$  respectively. In co-culture, IL-8 secretion was reduced by 35% compared with the sum of the IL-8 secretion of both tissue layers specimens cultured alone ( $n = 10$ ,  $P = 0.005$ ) (Fig. 1A).

### After mucosal challenge with toxin B of *C. difficile*, IL-8 secretion increases in co-culture

In order to determine whether mucosal inflammatory challenge modulates mucosa/submucosa interactions,



**Fig. 1.** Mucosa/submucosa interactions modulate IL-8 secretion in control condition and following mucosal challenge with toxin B of *C. difficile*. After 5 h of short-term organ culture, IL-8 secretion of the mucosa (cultured alone), submucosa (cultured alone), and co-culture was assessed by ELISA. IL-8 secretion of the co-culture and the sum of IL-8 secretion (normalized to the weight of the specimens in co-culture) of both tissue layers cultured alone were compared. In control conditions, IL-8 secretion in co-culture was lower than the sum of IL-8 secretion of both tissue layers cultured alone (A control condition,  $n = 10$ ). When the mucosa was pretreated with toxin B of *C. difficile* ( $10$  ng ml $^{-1}$ , 2 h), IL-8 secretion in co-culture was higher than the sum of IL-8 secretion of toxin B of *C. difficile*-treated mucosa and submucosa cultured alone (A with toxin B of *C. difficile* treatment,  $n = 6$ ). Values represent means  $\pm$  SE of independent experiments (paired  $t$ -test,  $*P < 0.05$  compared with the sum of the IL-8 secretion of both tissue layers cultured alone). The variations, between IL-8 secretion obtained in co-culture and the sum of the IL-8 secretion of both tissue layers cultured alone, was significantly greater with prior treatment of the mucosa with toxin B of *C. difficile* than without (B). Individual values of independent experiments are represented ( $n = 6$ , paired  $t$ -test,  $*P < 0.05$  compared with control conditions).

mucosa was preincubated with toxin B of *C. difficile* (10 ng ml<sup>-1</sup>) for 2 h. Mucosa was then co-cultured with submucosa. Under these conditions, IL-8 secretion was increased by 33% compared with the sum of the IL-8 secretion of both tissue layers specimens cultured alone ( $n=6$ ,  $P<0.05$ ) (Fig. 1A). Furthermore, as shown in Fig. 1B, the variations between IL-8 secretion in co-culture and the sum of the IL-8 secretion of both tissue layer specimens cultured alone was significantly greater following treatment of mucosa with toxin B of *C. difficile* than when mucosa was untreated.

*Interleukin-1 $\beta$  mediates the increase in IL-8 secretion induced by toxin B of C. difficile-treated mucosa*

Following preincubation of the submucosa with IL-1ra (10 ng ml<sup>-1</sup>;  $n=4$ ) or with an IL-1 $\beta$  neutralizing antibody (1:200;  $n=3$ ), toxin B of *C. difficile*-treated mucosa was placed in co-culture. Under these conditions, no toxin B of *C. difficile*-induced increase in IL-8 secretion was observed in co-culture (Fig. 2A and B,  $P<0.05$ ). In order to check whether IL-1 $\beta$  is able to induce IL-8 secretion in the submucosa, fragments of submucosa were incubated with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) for 6 h. Under these conditions, IL-8 secretion increased by 130% compared with control (Fig. 2C,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ).

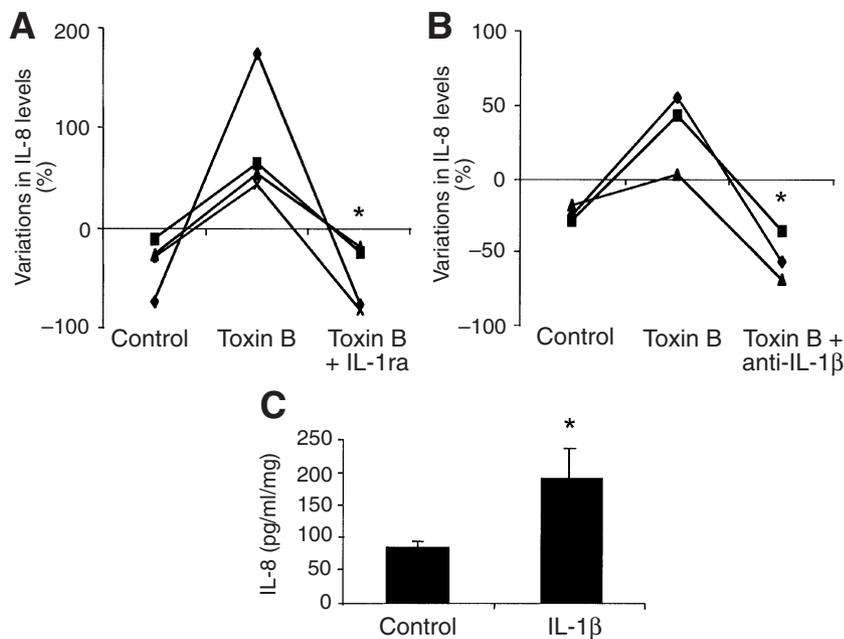
*Toxin B of C. difficile and IL-1 $\beta$  increase IL-8 immunoreactivity in enteric neurones and glial cells*

Co-culture of toxin B of *C. difficile*-treated mucosa with submucosa increased IL-8 immunoreactivity in submu-

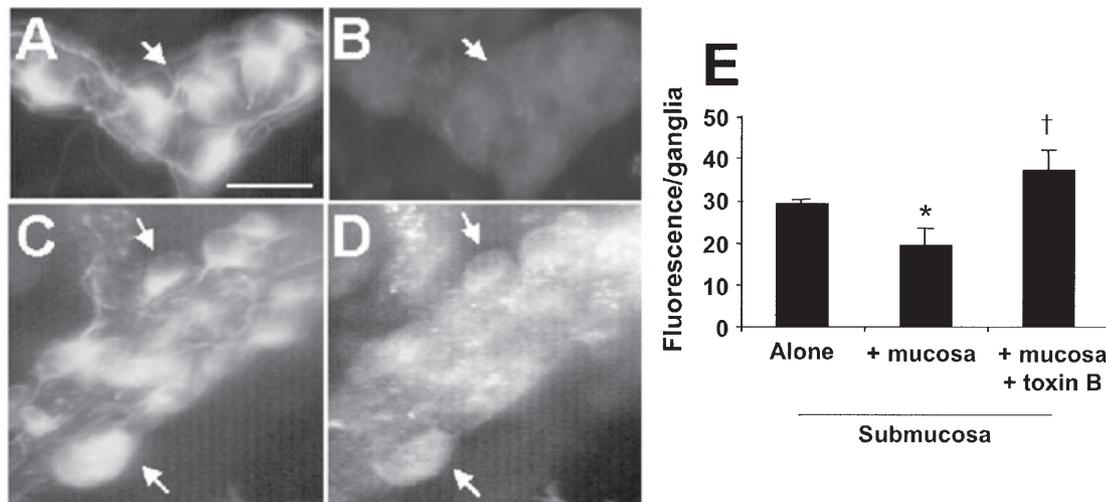
cosal neurones (Fig. 3C and D) compared with co-culture with untreated mucosa (Fig. 3A and B). Image analysis method revealed a significant 2.0-fold increase in IL-8 immunoreactivity in enteric ganglia of submucosal specimens co-cultured with toxin B of *C. difficile*-treated mucosa (Fig. 3E,  $P<0.05$ ,  $n=5$ ). Interestingly, IL-8 immunoreactivity in ganglia of submucosal specimens co-cultured with untreated mucosa was lower than in submucosal specimens cultured alone (Fig. 3E,  $P<0.05$ ,  $n=3$ ).

In order to verify whether this neuronal response to toxin B of *C. difficile* was not modified after dissection, intact preparations of mucosa/submucosa were incubated with toxin B of *C. difficile* (10 ng ml<sup>-1</sup>). In toxin B of *C. difficile*-treated preparation, IL-8 immunoreactivity was increased in submucosal ganglia (Fig. 4C and D) compared with control (Fig. 4A and B). Image analysis method revealed a significant 2.8-fold increase in IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia of intact tissue treated with toxin B of *C. difficile* compared with control (Fig. 4E,  $P<0.05$ ,  $n=6$ ). Moreover, incubation of the preparation with IL-1ra significantly reduced by 32% the toxin B of *C. difficile*-induced IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia (Fig. 4E,  $P<0.05$ ,  $n=6$ ).

Incubation of submucosal fragments with IL-1 $\beta$  reproduced a significant 2.1-fold increase in IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia (Fig. 5A,  $P<0.05$ ,  $n=5$ ). Labelling of enteric ganglia with the neuronal marker NF-200 kDa or the glial marker S-100 $\beta$  revealed an increase in IL-8 immunoreactivity in both submucosal neurones (Fig. 5B–E) and enteric glial cells (Fig. 5F–I).



**Fig. 2.** IL-1 $\beta$  mediates toxin B of *C. difficile*-induced IL-8 secretion in co-culture. IL-8 secretion in co-culture was higher with prior toxin B of *C. difficile* treatment of the mucosa than without. This increase was blocked by IL-1ra (10 ng ml<sup>-1</sup>) (A,  $n=4$  independent experiments) and the IL-1 $\beta$  neutralizing antibody (1:200) (B,  $n=3$  independent experiments) (one-way repeated measures ANOVA, \* $P<0.05$ , compared with the toxin B of *C. difficile* condition). After a 6 h treatment with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>), IL-8 secretion of human submucosa was higher than that observed under control conditions. (C, mean  $\pm$  SE,  $n=6$  independent experiments, paired  $t$ -test, \* $P<0.05$  compared with control).



**Fig. 3.** Toxin B of *C. difficile* increases IL-8 immunoreactivity in human submucosal ganglia in co-culture. Double labelling experiments showed that under control conditions, enteric neurones identified with NF-200 kDa (A, arrow) were not immunoreactive for IL-8 (B, arrow). Contrastingly, following mucosal treatment with toxin B of *C. difficile* (10 ng ml<sup>-1</sup>), submucosal neurones identified with NF-200 kDa (C, arrows) were immunoreactive for IL-8 (D, arrows). Quantitative image analysis revealed that IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia co-cultured with mucosa was lower than in ganglia from submucosa cultured alone (E, mean ± SE,  $n = 3$  independent experiments, paired  $t$ -test,  $*P < 0.05$  compared with the submucosa cultured alone condition). In contrast, IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia after co-culture with toxin B of *C. difficile*-treated mucosa was significantly higher than that observed in submucosa co-cultured with untreated mucosa (E; mean ± SE,  $n = 5$  independent experiments, paired  $t$ -test,  $*P < 0.05$  compared with the submucosa co-cultured with untreated mucosa condition). For quantitative image analysis, all images were taken with a video camera set at a constant gain. In addition, preabsorption of the tissue with the human recombinant IL-8 peptide abolished the IL-8 staining, demonstrating the specificity of the antibody. Scale bar = 25  $\mu$ m.

#### *Interleukin-1 $\beta$ increases IL-8 mRNA expression and secretion in NT2-N and SH-SY5Y cells*

Interleukin-8 secretion was not detected in undifferentiated NT2 as well as in undifferentiated SH-SY5Y cells, treated or not with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>). Contrastingly, incubation of differentiated NT2-N neuronal cells with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) induced a time-dependent increase in IL-8 secretion. IL-8 levels were significantly increased as early as 3 h after exposure to IL-1 $\beta$ , and after 6 h, a 67-fold increase was observed (Fig. 6A,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). A significant increase in IL-8 mRNA levels was also observed (Fig. 6B,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). In addition, IL-1 $\beta$  induced a dose-dependent increase in IL-8 secretion in human differentiated SH-SY5Y cells compared with control (Fig. 6C,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). IL-8 mRNA levels also increased in a dose-dependent manner following treatment with IL-1 $\beta$  (Fig. 6D,  $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ).

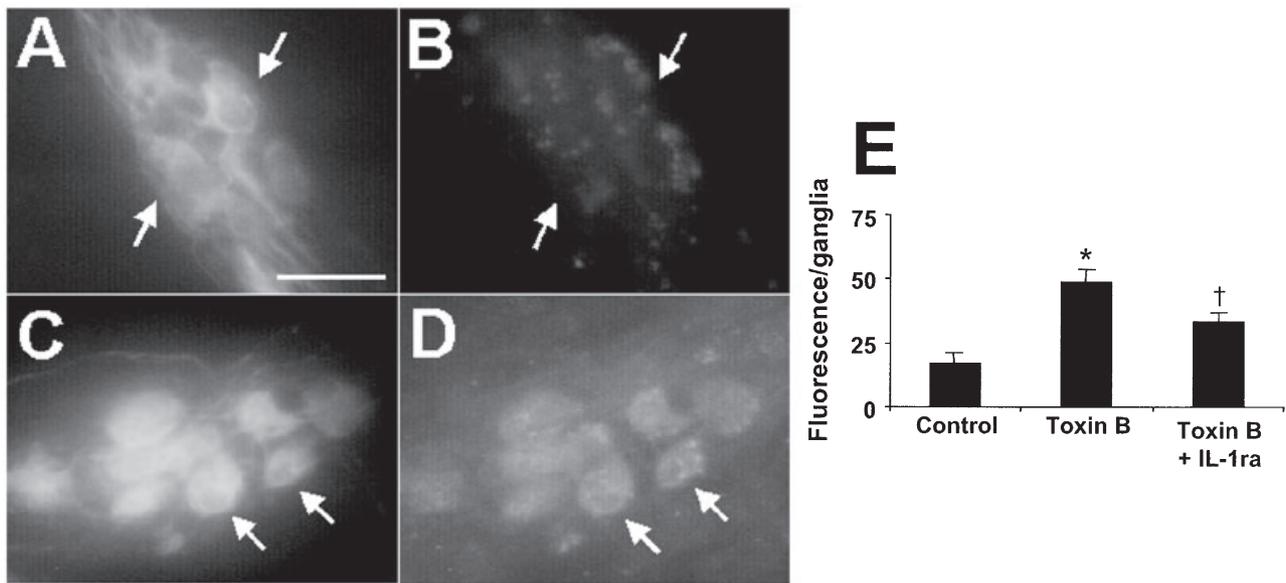
#### *p38 and ERK1/2 are involved in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 mRNA expression and secretion in neurones and human colonic submucosa*

Western blot analysis revealed that treatment of NT2-N cells with IL-1 $\beta$  did not affect levels of total p38 and ERK1/2 proteins (Fig. 7A and B). Contrastingly, after treatment

with IL-1 $\beta$ , phosphorylated p38 and ERK1/2 levels were found to significantly increase within 30 min compared with the control (Fig. 7A and B).

In order to confirm the involvement of p38 and ERK1/2 in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 expression and secretion, NT2-N cells were preincubated for 30 min with either the specific p38 inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M) or the specific ERK1/2 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M), or with both inhibitors together, prior to addition of IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>). SB203580 and PD98059 significantly reduced the IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion, i.e. by 49% and 42% respectively (Fig. 7C,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). The decrease in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion reached 78% when NT2-N cells were treated with both inhibitors. SB203580 and PD98059 likewise significantly reduced IL-1 $\beta$ -induced expression of IL-8 mRNA (Fig. 7D,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ).

Finally, in order to verify whether p38 and ERK1/2 pathways are involved in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion in human colonic submucosa, specimens of submucosa were preincubated for 30 min with either SB203580 (10  $\mu$ M) or PD98059 (50  $\mu$ M) or with both inhibitors, prior to addition of IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>). SB203580 and PD98059 significantly reduced IL-8 secretion, i.e. by 61% and 47% respectively (Fig. 8,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). After treatment with both inhibitors, an 83% decrease in IL-8 secretion was measured.



**Fig. 4.** Toxin B of *C. difficile* increases IL-8 immunoreactivity in intact mucosa/submucosa preparation. Double labelling experiments showed that under control conditions, enteric neurones identified with NF-200 kDa (A, arrows) were not immunoreactive for IL-8 (B, arrows). Contrastingly, following treatment with toxin B of *C. difficile* ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ), submucosal neurones identified with NF-200 kDa (C, arrows) were immunoreactive for IL-8 (D, arrows). Quantitative image analysis revealed that toxin B of *C. difficile*-treatment induced a significant increase in IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia compared with control. This increase was significantly reduced with IL-1ra ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (E, mean  $\pm$  SE,  $n = 6$  independent experiments, paired *t*-test, \* $P < 0.05$  compared with control condition, \*\* $P < 0.05$  compared with toxin B condition). For quantitative image analysis, all images were taken with a video camera set at a constant gain. In addition, preabsorption of the tissue with the human recombinant IL-8 peptide abolished the IL-8 staining, demonstrating the specificity of the antibody. Scale bar =  $25 \mu\text{m}$ .

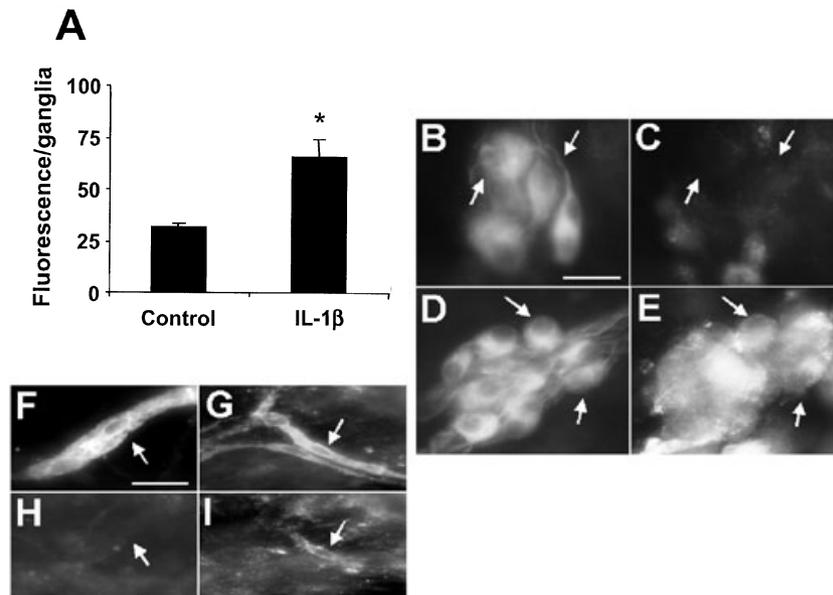
## Discussion

Our results, obtained in human model of co-culture, show that in response to mucosal inflammation caused by toxin B of *C. difficile*, cellular components of the mucosa and submucosa interact to induce IL-8 secretion through an IL-1 $\beta$ -dependent pathway. The fact that toxin B of *C. difficile* and IL-1 $\beta$  are able to induce IL-8 immunoreactivity in human enteric neurones, suggests that the ENS is involved in this response. Finally, we showed that IL-1 $\beta$  induces IL-8 secretion in various neuronal cell lines through p38 and ERK1/2-dependent intracellular transduction pathways.

In this study, we developed and used a co-culture model to provide evidence for interactions between components of the gut wall, i.e. the mucosa and the submucosa, in human colon. Furthermore, this model allowed us to investigate how pathogens or noxious stimuli can modify these interactions when targeting a specific component (e.g. the mucosa). This model, which is similar to that previously used to characterize interactions between epithelial cells and submucosal neurones, could be maintained under good conditions of viability (Neunlist *et al.*, 2003b). Although this co-culture model does not maintain the integrity of an intact mucosa/submucosa preparation, it preserves, unlike most cell line models, the cellular

organization within the mucosa and submucosa. This model disrupts, however, the contacts between the mucosal and submucosal cells and, in particular, the mucosal innervation by enteric nerves. Therefore, it might be not appropriate for the study of interactions between the mucosa and the submucosa upon parameters requiring cell/cell contacts or innervation. Nevertheless, the study of the effects of mucosa/submucosa interactions upon IL-8 secretion, both in normal and in infectious conditions, was not hampered by tissue disruption. Indeed, effects observed with the co-culture model were reproduced in intact preparation of mucosa/submucosa and were due to a diffusible factor, i.e. IL-1 $\beta$ .

In our study, mucosa/submucosa interactions were characterized based on IL-8 secretion. IL-8 secretion was chosen as a surrogate marker of the inflammatory response to *C. difficile* infection for several reasons. First, IL-8 is one of the major chemokines involved in the early response to infection by several intestinal pathogens such as *C. difficile* (Linevsky *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002) or *Shigella flexneri* (Sansone *et al.*, 1999). Second, IL-8 is involved in the recruitment of immune cells (Baggiolini *et al.*, 1989), and third, it stimulates epithelial cell migration and growth, which may be involved in mucosal repair processes (Wilson *et al.*, 1999; Brew *et al.*, 2000; Gillitzer and Goebeler, 2001). Similarly to the study of the regula-



**Fig. 5.** IL-1 $\beta$  increases IL-8 immunoreactivity in human submucosal neurones and glial cells. Quantitative image analysis revealed that IL-8 immunoreactivity in submucosal ganglia after treatment with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) was significantly higher than that observed in untreated tissues (A; mean  $\pm$  SE,  $n = 5$  independent experiments, paired  $t$ -test,  $*P < 0.05$  compared with control). Double labelling experiments showed that under control conditions, enteric neurones identified with NF-200 kDa (B, arrows) were not immunoreactive for IL-8 (C, arrows). Contrastingly, following treatment with IL-1 $\beta$ , submucosal neurones identified with NF-200 kDa (D, arrows) were immunoreactive for IL-8 (E, arrows). Similarly, under control conditions, enteric glial cells identified with S-100 $\beta$  (F, arrows) were not immunoreactive for IL-8 (G, arrows). Following treatment with IL-1 $\beta$ , IL-8 immunoreactivity (H, arrows) was detected in glial cells (I, arrows). For quantitative image analysis, all images were taken with a video camera set at a constant gain. In addition, preabsorption of the tissue with the human recombinant IL-8 peptide abolished the IL-8 staining, demonstrating the specificity of the antibody. Scale bar = 25  $\mu$ m.

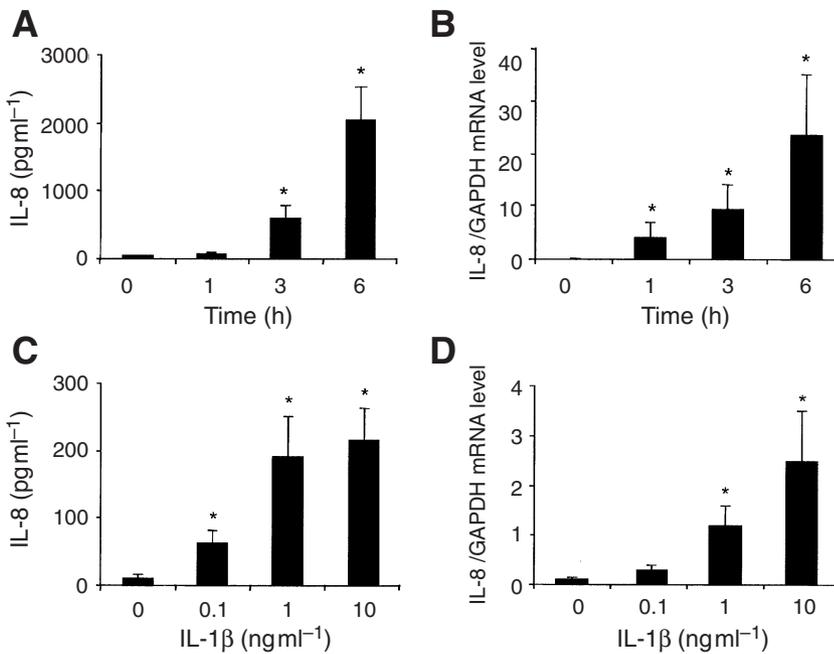
tion of IL-8 secretion, this model could be used to characterize the regulation of other cytokines or growth factors by mucosa/submucosa interactions.

In non-inflammatory conditions, mucosa and submucosa were shown to secrete IL-8. This is consistent with previous studies showing that IL-8 levels were observed in primary cultures of human normal colonocytes (Branka *et al.*, 1997), human monocytes (Warny *et al.*, 2000), or fibroblasts (Rogler *et al.*, 2001). One cannot, however, exclude that IL-8 secretion may be partly accounted for by a non-specific inflammatory response to pre or post-operative ischaemia. Contrastingly, co-cultured mucosa and submucosa specimens secreted lower levels of IL-8 than when cultured separately, suggesting that the mucosa and the submucosa interact to decrease IL-8 secretion. Mediators involved in this apparent downregulation of IL-8 secretion remain to be determined. A potential candidate is transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , which has been shown to reduce IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells or endothelial cells (Lugering *et al.*, 1998; Claud *et al.*, 2003), and is secreted by certain components of the human intestinal mucosa (Wang *et al.*, 1995).

Interestingly, when the mucosa was challenged with toxin B of *C. difficile* prior to co-culture, mucosa/submu-

cosa interactions in co-culture produce the opposite effect: an increase in IL-8 secretion was observed. These results are consistent with a previous study showing that toxin B of *C. difficile* induces IL-8 secretion in a human intestine/mouse xenograft model (Savidge *et al.*, 2003). Toxin B of *C. difficile* was also shown to induce IL-8 expression in human monocytes (Linevsky *et al.*, 1997) and epithelial cells (Kim *et al.*, 2002).

Our study identified IL-1 $\beta$  as a key mediator of the effect of toxin B of *C. difficile* on IL-8 secretion in co-culture. Indeed, IL-8 induction caused by toxin B of *C. difficile* was abolished by IL-1ra and the anti-IL-1 $\beta$  neutralizing antibody. Moreover, IL-1 $\beta$  was also able to induce IL-8 secretion in human colonic submucosa. Our study was not designed to identify the cell types that secrete IL-1 $\beta$ . Previous studies, however, have shown that human colonic mucosa and submucosa secrete and express higher levels of IL-1 $\beta$  in response to toxin B of *C. difficile* (Neunlist *et al.*, 2003), and have demonstrated that toxin B of *C. difficile* induces IL-1 $\beta$  expression in human monocytes and THP-1 cells (Flegel *et al.*, 1991; Warny *et al.*, 2000). IL-1 $\beta$  mediates various toxin B of *C. difficile*-induced effects. In rat, neutrophil migration in peritoneal cavities evoked by toxin A of *C. difficile* is mediated by IL-1 $\beta$  (Rocha *et al.*, 1997). IL-1 $\beta$  has also been shown to be



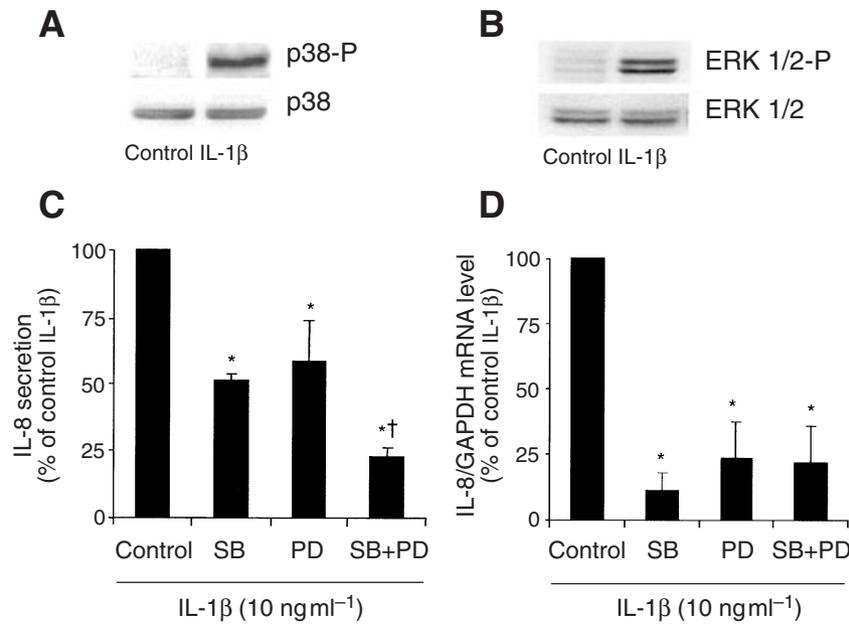
**Fig. 6.** IL-1 $\beta$  increases IL-8 secretion and mRNA expression in human neuronal cell lines. IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) induced a significant time-dependent increase in IL-8 secretion as early as 3 h in NT2-N cells (A, mean  $\pm$  SE,  $n = 5$  independent experiments, one-way repeated measures ANOVA,  $*P < 0.05$  compared with control). IL-1 $\beta$  also induced a significant time-dependent increase in IL-8 mRNA levels (normalized to GAPDH) in 3 h in NT2-N cells (B, mean  $\pm$  SE,  $n = 5$  independent experiments, one-way repeated measures ANOVA,  $*P < 0.05$  compared with control). In differentiated SH-SY5Y cells, IL-1 $\beta$  induced a dose-dependent increase in IL-8 secretion compared with control (24 h after treatment) (C, mean  $\pm$  SE,  $n = 4$  independent experiments, one-way repeated measures ANOVA,  $*P < 0.05$  compared with control). IL-1 $\beta$  also induced a dose-dependent increase in IL-8 mRNA levels (normalized to GAPDH) (D, mean  $\pm$  SE,  $n = 4$  independent experiments, one-way repeated measures ANOVA,  $*P < 0.05$  compared with control).

involved in toxin B of *C. difficile*-induced activation of human VIP immunoreactive submucosal neurones (Neunlist *et al.*, 2003a).

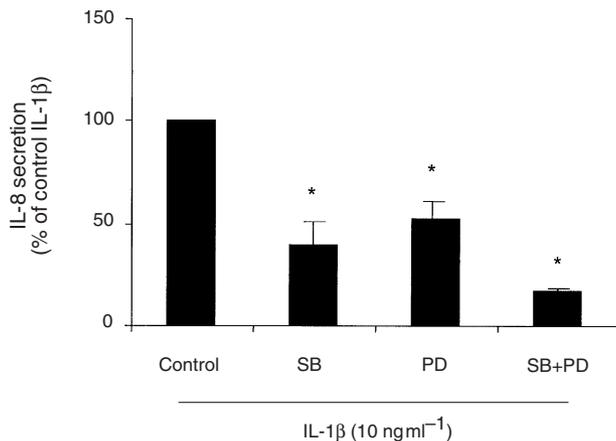
In the second part of the study, we showed that the ENS is involved in the response of the submucosa to a mucosal challenge with toxin B of *C. difficile* or IL-1 $\beta$ , as demonstrated by the observed increase in IL-8 immunoreactivity. Interestingly, mucosa/submucosa interactions were shown to decrease IL-8 immunoreactivity in control condition compared with submucosa cultured alone. Only few studies have investigated the secretion of cytokines/chemokines by components of the ENS. For instance, rat enteric glial cells have been shown to secrete IL-6 after challenge with IL-1 $\beta$  (Ruhl *et al.*, 2001), and a preliminary study suggests that myenteric neurones can synthesize the chemokine MIP-1 $\alpha$  (De Giorgio *et al.*, 2000). Enteric neurones were only shown to be activated by IL-1 $\beta$  in guinea pigs (Xia *et al.*, 1999; Tjwa *et al.*, 2003) and humans (Neunlist *et al.*, 2003). It is, however, the first time that both human enteric neurones and enteric glial cells are shown to express IL-8 in response to toxin B of *C. difficile* and IL-1 $\beta$ . However, other components of the submucosa such as fibroblasts, myofibroblasts, or endothelial cells, may also be involved in IL-8 secretion induced by IL-1 $\beta$  (Pang *et al.*, 1994; Nilsen *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 2001; Okuno *et al.*, 2002).

In order to characterize the intracellular pathways involved in the IL-1 $\beta$ -dependent neuronal secretion, we used two well-characterized human neuronal cell lines, NT2-N and differentiated SH-SY5Y cells. These cell lines were chosen because no method is currently available to

isolate and maintain human enteric neurones in culture. NT2-N and SH-SY5Y cells have been shown to respond to IL-1 $\beta$  (Smith and Hainsworth, 1998; Guo *et al.*, 2003). In this study, we showed that IL-1 $\beta$  is able to increase IL-8 secretion and IL-8 mRNA levels in both neuronal cell lines. Furthermore, we observed that these cell lines need to acquire a neuronal phenotype to secrete IL-8, as undifferentiated NT2 or SH-SY5Y cells do not secrete detectable levels of IL-8 in control and following treatment with IL-1 $\beta$ . Our results obtained with SH-SY5Y and NT2-N cells are consistent with previous studies showing that in a differentiated neuroblastoma cell line (SK-N-SH), IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  induce expression of IL-8 (Bossu *et al.*, 1997; Chuluyan *et al.*, 1998) and other chemokines, such as MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , in NT2-N cells (Guo *et al.*, 2003). Furthermore, our results demonstrate the involvement of p38 and ERK1/2 MAP kinases in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion as well as in the increase in IL-8 mRNA levels in NT2-N cells. IL-1 $\beta$  has already been shown to activate the p38 MAP kinase pathway in hippocampal (Srinivasan *et al.*, 2004) and cortical neurones (Li *et al.*, 2003). In intestinal epithelial cells, both p38 and ERK1/2-dependent pathways are associated with IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ -induced IL-8 production (Jijon *et al.*, 2002; Garat and Arend, 2003; Parhar *et al.*, 2003). Our study did not allow us to determine whether IL-1 $\beta$ -induced increase in IL-8 secretion occurs at the transcriptional or post-transcriptional level. However, various studies have shown that activation of p38 MAP kinase leads to the stabilization of IL-8 mRNA through AU-rich elements (Holtmann *et al.*, 1999; Winzen *et al.*, 1999). In addition, inhibition of both p38 and ERK



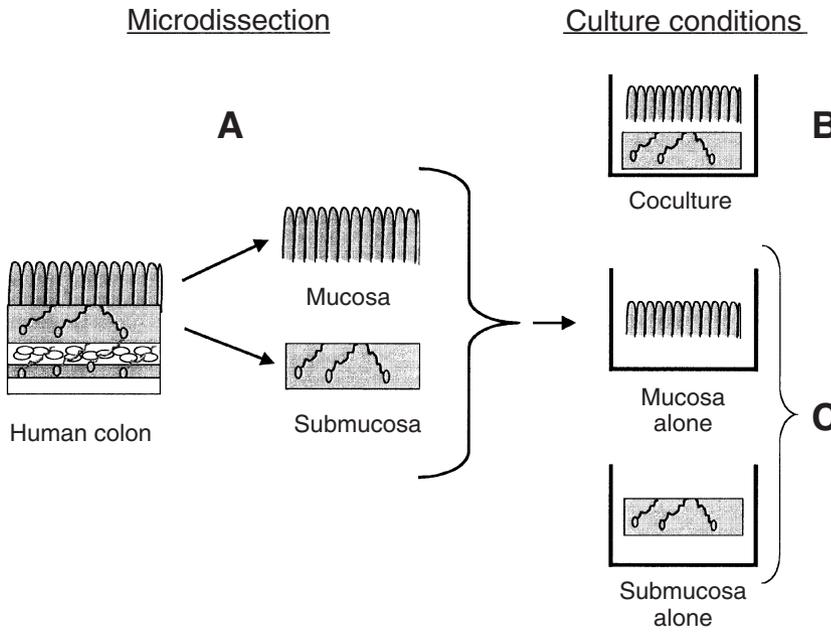
**Fig. 7.** p38 and ERK1/2 MAP kinase pathways are involved in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion and IL-8 mRNA expression in NT2-N cells. Western blot analysis of protein extracts showed that a 30 min treatment with IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) did not alter levels of total p38 (A) and ERK1/2 as compared with control (B). Contrastingly, treatment with IL-1 $\beta$  significantly increased levels of the phosphorylated-p38 (p38-P) (A) and phosphorylated-ERK1/2 (ERK1/2-P) as compared with control (B) (one representative experiment of four independent experiments). The p38 inhibitor SB203580 (SB, 10  $\mu$ M), the ERK1/2 inhibitor PD98059 (PD, 50  $\mu$ M), or both inhibitors together significantly reduced IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion (10 ng ml<sup>-1</sup>) measured after a 6 h incubation. Results are normalized to IL-8 levels obtained with IL-1 $\beta$  treatment alone (1041  $\pm$  536 pg ml<sup>-1</sup>,  $n$  = 5). (C, mean  $\pm$  SE,  $n$  = 5 independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \* $P$  < 0.05 compared with control, \*\* $P$  < 0.05 compared with the SB203580 and the PD98059 conditions). p38 and ERK1/2 inhibitors decreased IL-8 mRNA levels (normalized to GAPDH) induced by IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) after a 3 h incubation. Results were normalized to control levels obtained with IL-1 $\beta$  alone (35  $\pm$  17 arbitrary units,  $n$  = 5). (D, mean  $\pm$  SE,  $n$  = 5 independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \* $P$  < 0.05 compared with control).



**Fig. 8.** IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion in the human submucosa involves p38 and ERK1/2 MAPK kinase pathways. The p38 inhibitor SB203580 (SB, 10  $\mu$ M), the ERK1/2 inhibitor PD98059 (PD, 50  $\mu$ M), or both inhibitors together significantly decreased IL-8 secretion induced by IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) measured after a 6 h incubation. Results were normalized to control levels obtained with IL-1 $\beta$  alone (367  $\pm$  75 pg ml<sup>-1</sup>). (mean  $\pm$  SE,  $n$  = 4 independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \* $P$  < 0.05 compared with control).

1/2 MAP kinases in NT2-N cells did not fully inhibit the effect of IL-1 $\beta$  on IL-8 secretion, suggesting that other intracellular pathways may be involved. The NF- $\kappa$ B-dependent pathway, which has been shown to play a role in the regulation of IL-8 expression in response to IL-1 in various cell types, such as intestinal epithelial cells (Garat and Arend, 2003; Parhar *et al.*, 2003) and fibroblasts (Rogler *et al.*, 2001), may also be involved in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion. Preliminary experiments have shown that IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion in NT2-N cells is reduced by caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of the NF- $\kappa$ B-dependent pathway (E. Tixier and M. Neunlist, unpubl. results). The JNK-dependent pathway may also be involved in IL-1 $\beta$ -induced IL-8 secretion, as shown in intestinal epithelial cells (Böcker *et al.*, 2000; Garat and Arend, 2003).

In conclusion, our results suggest that mucosa/submucosa interactions regulate IL-8 secretion during inflammatory processes in human. In addition, our results suggest that the ENS could participate in intestinal inflammatory response by producing IL-8. The ability of enteric neurons to secrete chemokines, such as IL-8, during an inflammatory challenge may partly account for the presence of inflammatory infiltrates in enteric ganglia, which



**Fig. 9.** Schematic representation of the co-culture model. Fragments of human colon were first microdissected to separate and isolate the mucosa and submucosa (A). Specimens of mucosa and submucosa were either co-cultured (B) or cultured alone (C).

could ultimately lead to the development of enteric neuropathies, as observed in post-infectious irritable bowel syndrome or inflammatory bowel diseases.

**Experimental procedures**

*Tissue specimens*

Tissue specimens were obtained from 35 patients (mean age, 65.7 ± 3.7 years) who underwent surgery for colonic adenocarcinoma, according to the guidelines of the French ethics committee for research on human tissues. None of the patients suffered from bowel obstruction or other colonic disorders. Normal colon fragments (taken at a distance from the tumour) were pinned with the mucosa down in a sterile Sylgard coated dissection dish containing cold (4°C) oxygenated sterile Krebs solution (117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 11 mM glucose) which was changed every 10 min. The muscular layers were removed under a dissection microscope.

*Short-term organ co-culture model*

In order to characterize interactions between the mucosa and the submucosa, we developed a co-culture model, including human mucosa and submucosa, derived from that previously described (Neunlist *et al.*, 2003b). After dissection of the muscular layers, the tissue was pinned in the dish with the mucosa up and the latter was stripped. The submucosal layer, containing the Meissner's plexus, was then carefully dissected with fine scissors (Fig. 9A). A piece of mucosa was then fixed above a piece of submucosa in a sterile dish (Fig. 9B). In addition, one piece of mucosa and submucosa from the same patient were cultured separately to assess their individual response (Fig. 9C). Specimens of mucosal (1 × 1 cm, n = 38, 51.7 ± 6.2 mg) and submucosal layers (0.5 × 0.5 cm, n = 60, 17.7 ± 7.1 mg) were maintained in short-term organ culture for 5 h in DMEM/Ham-F12 supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 IU ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 1.1 µg ml<sup>-1</sup> amphotericin B, 20 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin (all from Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 2.1 g l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, on a rocking-tray in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>; 37°C).

**Table 1.** Experimental conditions used for the characterization of mucosa/submucosa interactions, with or without prior inflammatory challenge of the mucosa with toxin B of *C. difficile*.

	IL-8 response (pg ml <sup>-1</sup> )		
	Mucosa	Submucosa	Co-culture
Control	M <sub>∅</sub>	S <sub>∅</sub>	M <sub>∅</sub> + S <sub>∅</sub>
Mucosal inflammation	M <sub>toxin B</sub>	S <sub>∅</sub>	M <sub>toxin B</sub> + S <sub>∅</sub>
Mucosal inflammation/IL-1ra	M <sub>toxin B+IL-1ra</sub>	S <sub>IL-1ra</sub>	M <sub>toxin B+IL-1ra</sub> + S <sub>IL-1ra</sub>
Mucosal inflammation/anti-IL-1β	M <sub>toxin B+anti-IL-1β</sub>	S <sub>anti-IL-1β</sub>	M <sub>toxin B+anti-IL-1β</sub> + S <sub>anti-IL-1β</sub>

M<sub>∅</sub>, control mucosa; S<sub>∅</sub>, control submucosa; M<sub>toxin B</sub>, toxin B-treated mucosa; M<sub>toxin B+IL-1ra</sub>, IL-1ra and toxin B-treated mucosa; S<sub>IL-1ra</sub>, IL-1ra-treated submucosa; M<sub>toxin B+anti-IL-1β</sub>, anti-IL-1β and toxin B-treated mucosa; S<sub>anti-IL-1β</sub>, anti-IL-1β-treated submucosa.

In order to explore mucosa/submucosa interactions in response to an inflammatory challenge, specimens of mucosa were first treated with toxin B of *C. difficile* (10 ng ml<sup>-1</sup>) for 2 h in culture medium prior to co-culture with submucosa. Toxin B of *C. difficile* from the VPI 10463 strain was purified as previously described (Just *et al.*, 1997). Specimens of submucosa were concomitantly maintained in short-term organ culture separately. After a 2 h incubation, all specimens were thoroughly washed four times in fresh culture medium. Specimens of mucosa and submucosa were then either co-cultured or cultured alone as described in Fig. 9. Experimental conditions used with the co-culture model are summarized in Table 1. At the end of the short-term organ culture, the supernatant was removed and stored at -80°C, and all specimens of mucosa and submucosa were weighted.

In some experiments, intact preparations of whole mucosa (not dissected mucosa and submucosa) were incubated with toxin B of *C. difficile* (10 ng ml<sup>-1</sup>), or specimens of submucosa were incubated alone with IL-1β (10 ng ml<sup>-1</sup>) (Abcys, Paris, France). At the end of the short-term organ culture, supernatant was removed and stored at -80°C.

Preliminary studies have shown that colchicine-treatment enhanced IL-8 immunoreactivity in enteric ganglia. Therefore, for detection of IL-8 by immunohistochemistry, specimens of tissue were further maintained in organ culture with colchicine (40 μM) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) overnight, prior fixation for 3 h in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde (Sigma) at room temperature.

### Study of mucosa/submucosa interactions

In order to identify mucosa/submucosa interactions, we compared the level of IL-8 secreted by specimens of mucosa and submucosa cultured alone (Fig. 9C) with that obtained when mucosa and submucosa were cultured together (Fig. 9B). IL-8 secretion by mucosal and submucosal specimens cultured alone was measured. Values were then estimated for the weight of each tissue layer specimen present in the co-culture as follows:

$$IL-8_m = (IL-8_{ma}/W_{ma}) \times W_{mc}$$

Where: IL-8<sub>m</sub> is the estimated IL-8 secretion of the specimen of mucosa cultured alone, if it had the same weight as the one maintained in co-culture;

W<sub>mc</sub> is the weight of the mucosa specimen co-cultured with submucosa;

W<sub>ma</sub> is the weight of the mucosa specimen cultured alone;

IL-8<sub>ma</sub> is the measured IL-8 secretion of the mucosa specimen cultured alone.

$$IL-8_{sm} = (IL-8_{sma}/W_{sma}) \times W_{smc}$$

Where: IL-8<sub>sm</sub> is the estimated IL-8 secretion of the specimen of submucosa cultured alone, if it had the same weight as the one maintained in co-culture;

W<sub>smc</sub> is the weight of the submucosa specimen co-cultured with mucosa;

W<sub>sma</sub> is the weight of the submucosa specimen cultured alone;

IL-8<sub>sma</sub> is the measured IL-8 secretion of the submucosa specimen cultured alone.

The sum of the estimated IL-8 secretion of the mucosa and submucosa (IL-8<sub>m</sub> + IL-8<sub>sm</sub>) was then compared with IL-8 secretion measured in co-culture.

In addition, IL-8 secretion measured in co-culture was normalized to the sum of the estimated IL-8 secretion of the mucosa and submucosa cultured alone as follows:

$$\Delta = 100 \times ((IL-8_c - \text{Sum } IL-8_a)/\text{Sum } IL-8_a)$$

where, Δ is the variation of IL-8 secretion;

IL-8<sub>c</sub> is the IL-8 secretion measured in co-culture;

Sum IL-8<sub>a</sub> is the sum of the estimated IL-8 secretion of the mucosa and submucosa cultured alone (IL-8<sub>m</sub> + IL-8<sub>sm</sub>).

### Cell culture

Human Ntera2/cL.D1 (NT2) fibroblast cells (LGC Promochem, Molsheim, France) were cultured and differentiated into neurones (NT2-N) as previously described by Pleasure *et al.* (1992). Cells were plated at a density of 2 × 10<sup>6</sup> per 75 cm<sup>2</sup> dishes in DMEM (4.5 g l<sup>-1</sup> glucose), 10% FCS, and 10 μM all-trans retinoic acid (Sigma) dissolved in DMSO and cultured for 5 weeks. Medium was changed twice a week. Cells were then replated at 1:6 and grown for two more days in the same medium without all-trans retinoic acid. Neuronal cells growing atop a monolayer of non-neuronal cells were dislodged with trypsin and plated in 12-well plates on Matrigel (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Cells were cultured in DMEM with 10% FCS supplemented with 1 μM cytosine arabinoside, 10 μM fluorodesoxyuridine, and 10 μM uridine (Sigma) for an additional week. Experiments were performed in DMEM with 10% FCS.

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells (The European Collection of Cell Culture, Salisbury, UK) were grown in DMEM/Ham-F12 with 10% FCS. In order to induce differentiation, 0.5 × 10<sup>6</sup> cells were seeded in 12-well plates and treated with 10 μM all-trans retinoic acid every two days for a week. Experiments were performed in DMEM/Ham-F12 with 10% FCS.

### Pharmacological study

Human recombinant IL-1β (AbCys) was used in this study. IL-1 receptor antagonist [(IL-1ra) 10 ng ml<sup>-1</sup>; Tebu, Le Perray en Yvelines, France] or the anti-IL-1β neutralizing antibody (1:200; Sigma) was added to the medium of the submucosa culture 1 h prior to co-culture with mucosa (Table 1). The optimal concentration of neutralizing anti-IL-1β antibody was determined as the concentration required to abolish the IL-1β-induced IL-8 secretion in SH-SY5Y cells (data not shown). The submucosa or NT2-N neurones were preincubated for 30 min with the p38 inhibitor SB203580 (10 μM; Calbiochem, VWR, Strasbourg, France) and the ERK1/2 inhibitor PD98059 (50 μM; Calbiochem) prior to addition of IL-1β.

### Immunohistochemistry

After fixation, the submucosa was washed in PBS and permeabilized for 1 h in PBS/NaN<sub>3</sub> with 0.5% Triton X-100 (Tx) (Sigma) and 4% horse serum (HS) (Sigma). Permeabilized submucosa was incubated with a combination of the following

primary antibodies diluted in PBS/NaN<sub>3</sub>/Tx/HS for 18–20 h at room temperature: mouse anti-IL-8 (1:200, Diaclone, Besançon, France), rabbit anti-neurofilament 200 kDa (NF200) 1:250, Chemicon, AbCys, or rabbit anti-S100 $\beta$  (1:10 000, Swant, Switzerland). Submucosa were then washed in PBS and incubated for 3 h with the following secondary antibodies coupled to fluorophores: a donkey anti-mouse IgG conjugated to carboxymethylindocyanine (Cy3, 1:500), a donkey anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC, 1:200), and a donkey anti-rabbit IgG conjugated to 7-amino-4-indodicarbocyanin (Cy5, 1:500) (All from Jackson ImmunoResearch, Immunotech, Marseille, France).

Immunostained submucosal plexus was analysed under a fluorescence microscope (Olympus IX 50; Olympus, Hamburg, Germany) equipped with adequate filter cubes. Pictures were acquired with a black and white video camera (4910 CoHu, SL Microtest, Jena, Germany) connected to a Macintosh computer via a frame-grabber card (Scion Image; SL Microtest). For the analysis of IL-8 immunoreactivity, fluorescence intensity of at least 15 submucosal ganglia was analysed in each preparation. The outline of the ganglia was defined with the cursor and mean fluorescence level of the pixels within the delimited area was determined using Scion Image software program. The background fluorescence of the area next to each ganglia was subtracted from the fluorescence level of each ganglia.

Preabsorption experiments were performed to verify the specificity of the mouse anti-IL-8 antibody. The mouse anti-IL-8 antibody (1:200) was first preincubated with the human recombinant IL-8 peptide (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , AbCys) for 2 h at room temperature prior to incubation with the submucosa. Following the immunohistochemical staining protocol previously described, this procedure resulted in a complete loss of IL-8 immunoreactivity in the enteric ganglia.

#### Measurement of IL-8 secretion

Supernatants of cell or tissue cultures were collected, and IL-8 protein levels, determined by ELISA (BD-Pharmingen, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's instructions. Each sample was assessed in duplicate.

#### Analysis of IL-8 mRNA levels by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from cells using tri Reagent (Euromedex, Souffel Weversheim, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1  $\mu\text{g}$ ), random hexamers (0.5  $\mu\text{g}$ ; Amersham, Orsay, France), dNTPs (10 mM each; Invitrogen), and Rnasin (20 units, Promega, Madison, WI) were used to synthesize single-stranded cDNA using the Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase kit (200 units, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, in a total volume of 20  $\mu\text{l}$ . Amplification conditions for the IL-8 and glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) templates were optimized for the RotorGene 2000 instrument (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). PCRs were performed with 2  $\mu\text{l}$  of template (GAPDH cDNA was diluted at 1:10 and IL-8 cDNA was not diluted), 0.1  $\mu\text{l}$  of a solution of SYBR Green I diluted at 1:100 (Roche, Meylan, France), 10 pM of each primer, 0.25 mM dNTPs, and the Titanium Taq DNA

polymerase kit (Clontech, Ozyme), according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: denaturation, 5 min at 95°C; amplification, 35 cycles including denaturation, 5 s at 95°C, annealing, 15 s at 62°C for GAPDH, and 63°C for IL-8, and extension, 20 s at 72°C and 15 s at 89°C for GAPDH and 83°C for IL-8. Primers were chosen on separate exons to amplify cDNA but not genomic DNA. The following primers were used: GAPDH forward 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'; GAPDH reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; IL-8 forward 5'-CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3'; IL-8 reverse 5'-TATGCACTGACATCTAAGTTCTT-3'. An external standard curve was generated with serial dilutions of control cDNA, by plotting the relative amounts of these dilutions against the corresponding C<sub>t</sub> (threshold cycle) values. The amount of IL-8 and GAPDH was calculated from these standard curves using the RotorGene software (Ozyme). Samples were tested in triplicate and the average values were used for quantification. For each sample, the ratio between the relative amounts of IL-8 and GAPDH was calculated to compensate for variations in quantity or quality of starting mRNA as well as for differences in reverse transcriptase efficiency.

#### Western blot analysis

NT2-N cells were first harvested from matrigel matrice using BD cell recovery solution (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. Proteins were extracted by lysing the cells in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-deoxycholate) supplemented with the complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Protein content was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, Marne La Coquette, France). Twenty-five to 50  $\mu\text{g}$  of protein was separated by SDS-PAGE on a 4–12% Bis-Tris gel (Invitrogen) and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Merck eurolab, Fontenay-sous-Bois, France). The membrane was blocked for 1 h in a 5% blocking buffer solution (Bio-Rad) and then probed with a rabbit anti-p38 MAPK antibody (1:1000), a rabbit anti-phosphorylated p38 MAPK antibody (1:1000), a rabbit anti-p42/p44 (ERK1/2) MAPK 1:1000, or a rabbit anti-phosphorylated p42/p44 MAPK (1:1000) (all from Cell Signalling, Ozyme) overnight at 4°C. Membranes were then washed in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) and incubated for 1 h with anti-rabbit IgG coupled to horse radish peroxidase (1:10 000, Amersham). Immunoblots were incubated with ECL chemiluminescent substrate (Amersham). Intensity of the bands was analysed using the Scion image software.

#### Statistical analysis

Values are given as mean  $\pm$  SE. Conditions were compared using a one-way analysis of variance for repeated measures for multiple comparisons, or using a paired Student's *t*-test. Differences were considered significant for  $P < 0.05$ .

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Departments of Gastrointestinal Surgery and Pathology for their valuable contribution to this project. ET was supported in part by a grant from Negma-gild.

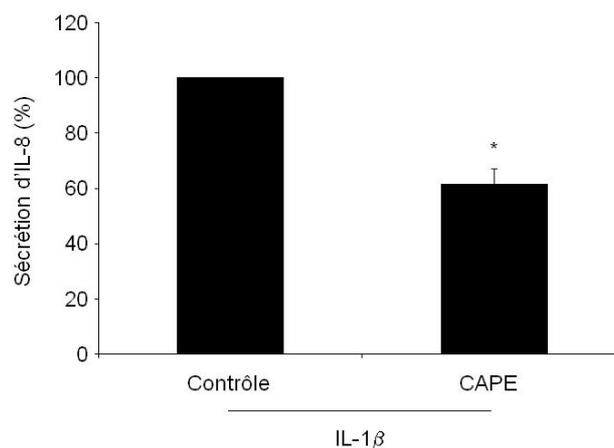
## References

- Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**: 1045–1049.
- Böcker, U., Schottelius, A., Watson, J.M., Holt, L., Licato, L.L., Brenner, D.A., *et al.* (2000) Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **275**: 12207–12213.
- Bossu, P., Ruggiero, P., Macchia, G., Maurizi, G., Bizzarri, C., Neumann, D., *et al.* (1997) Interaction between interleukin-1 and ciliary neurotrophic factor in the regulation of neuroblastoma cell functions. *Eur Cytokine Netw* **8**: 367–374.
- Branka, J.E., Vallette, G., Jarry, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Van P.N., and Labois, C.L. (1997) Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* **112**: 1887–1894.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, A.R., Slavin, J., and Christmas, S.E. (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells *in vitro*. *Cytokine* **12**: 78–85.
- Chuluyan, H.E., Lang, B.J., Yoshimura, T., Kenney, J.S., and Issekutz, A.C. (1998) Chemokine production and adhesion molecule expression by neural cells exposed to IL-1, TNF alpha and interferon gamma. *Life Sci* **63**: 1939–1952.
- Claud, E.C., Savidge, T., and Walker, W.A. (2003) Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* **53**: 419–425.
- De Giorgio, R., Barbara, G., Pulsatelli, L., Stanghellini, V., Dolzani, P., Meliconi, R., *et al.* (2000) Chemokine expression and lymphocytes subsets in patients with idiopathic myenteric ganglionitis. *Gastroenterology* **118**: A630. (Abstract).
- Fiocchi, C. (1997) Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* **273**: G769–G775.
- Flegel, W.A., Muller, F., Daubener, W., Fischer, H.G., Hadding, U., and Northoff, H. (1991) Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infect Immun* **59**: 3659–3666.
- Garat, C., and Arend, W.P. (2003) Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Cytokine* **23**: 31–40.
- Gillitzer, R., and Goebeler, M. (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* **69**: 513–521.
- Guo, C.J., Douglas, S.D., Lai, J.P., Pleasure, D.E., Li, Y., Williams, M., *et al.* (2003) Interleukin-1beta stimulates macrophage inflammatory protein-1alpha and -1beta expression in human neuronal cells (NT2-N). *J Neurochem* **84**: 997–1005.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., *et al.* (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **19**: 6742–6753.
- Jijon, H.B., Panenka, W.J., Madsen, K.L., and Parsons, H.G. (2002) MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C31–C41.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95**: 55–65.
- Just, I., and Gerhard, R. (2004) Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 23–47.
- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., and Aktories, K. (1997) *Clostridium difficile* toxin B as a probe for Rho GTPases. In *Bacterial Toxins-Tools in Cell Biology and Pharmacology*. Aktories, K. (ed.). London: Chapman & Hall, pp. 159–168.
- Khan, I., and Collins, S.M. (1994) Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* **107**: 691–700.
- Kim, J.M., Kim, J.S., Jun, H.C., Oh, Y.K., Song, I.S., and Kim, C.Y. (2002) Differential expression and polarized secretion of CXCL1 and CXCL2 chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile* toxin A. *Microbiol Immunol* **46**: 333–342.
- Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* **243**: 1464–1466.
- Li, Y., Liu, L., Barger, S.W., and Griffin, W.S. (2003) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* **23**: 1605–1611.
- Linden, D.R., Sharkey, K.A., Ho, W., and Mawe, G.M. (2004) Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurons in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* **15**: 191–205.
- Linevsky, J.K., Pothoulakis, C., Keates, S., Warny, M., Keates, A.C., Lamont, J.T., and Kelly, C.P. (1997) IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. *Am J Physiol* **273**: G1333–G1340.
- Lugering, N., Kucharzik, T., Gockel, H., Sorg, C., Stoll, R., and Domschke, W. (1998) Human intestinal epithelial cells down-regulate IL-8 expression in human intestinal microvascular endothelial cells; role of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1). *Clin Exp Immunol* **114**: 377–384.
- Neunlist, M., Barouk, J., Michel, K., Just, I., Oreshkova, T., Schemann, M., and Galmiche, J.P. (2003a) Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1beta-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G1049–G1055.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreshkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Labois, C.L., *et al.* (2003b) Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G1028–G1036.
- Nilsen, E.M., Johansen, F.E., Jahnsen, F.L., Lundin, K.E., Scholz, T., Brandtzaeg, P., and Haraldsen, G. (1998) Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* **42**: 635–642.
- Okuno, T., Andoh, A., Bamba, S., Araki, Y., Fujiyama, Y., Fujiyama, M., and Bamba, T. (2002) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol* **37**: 317–324.
- Pang, G., Couch, L., Batey, R., Clancy, R., and Cripps, A.

- (1994) GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* **96**: 437–443.
- Parhar, K., Ray, A., Steinbrecher, U., Nelson, C., and Salh, B. (2003) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* **108**: 502–512.
- Pleasure, S.J., Page, C., and Lee, V.M. (1992) Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* **12**: 1802–1815.
- Rocha, M.F., Maia, M.E., Bezerra, L.R., Lysterly, D.M., Guerant, R.L., Ribeiro, R.A., and Lima, A.A. (1997) *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infect Immun* **65**: 2740–2746.
- Rogler, G., Gelbmann, C.M., Vogl, D., Brunner, M., Scholmerich, J., Falk, W., et al. (2001) Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures. *Scand J Gastroenterol* **36**: 389–398.
- Ruhl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001) Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G1163–G1171.
- Sansonetti, P.J., Arondel, J., Huerre, M., Harada, A., and Matsushima, K. (1999) Interleukin-8 controls bacterial trans-epithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun* **67**: 1471–1480.
- Savidge, T.C., Pan, W.H., Newman, P., O'Brien, M., Anton, P.M., and Pothoulakis, C. (2003) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* **125**: 413–420.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16**(Suppl. 1): 55–59.
- Smith, E.L., and Hainsworth, A.H. (1998) Acute effects of interleukin-1 beta on noradrenaline release from the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Neurosci Lett* **251**: 89–92.
- Srinivasan, D., Yen, J.H., Joseph, D.J., and Friedman, W. (2004) Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J Neurosci* **24**: 6482–6488.
- Tjwa, E.T., Bradley, J.M., Keenan, C.M., Kroese, A.B., and Sharkey, K.A. (2003) Interleukin-1beta activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G1268–G1276.
- Wang, D., Zhou, G.H., Birkenmeier, T.M., Gong, J., Sun, L., and Brattain, M.G. (1995) Autocrine transforming growth factor beta 1 modulates the expression of integrin alpha 5 beta 1 in human colon carcinoma FET cells. *J Biol Chem* **270**: 14154–14159.
- Warny, M., Keates, A.C., Keates, S., Castagliuolo, I., Zacks, J.K., Aboudola, S., et al. (2000) p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* **105**: 1147–1156.
- Wilson, A.J., Byron, K., and Gibson, P.R. (1999) Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells *in vitro*. *Clin Sci* **97**: 385–390.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., et al. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* **18**: 4969–4980.
- Wood, J.D. (1994) Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **48**: 17–29.
- Xia, Y., Hu, H.Z., Liu, S., Ren, J., Zafirov, D.H., and Wood, J.D. (1999) IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* **103**: 1309–1316.

**Etude de l'implication potentielle de NF- $\kappa$ B dans la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N.**

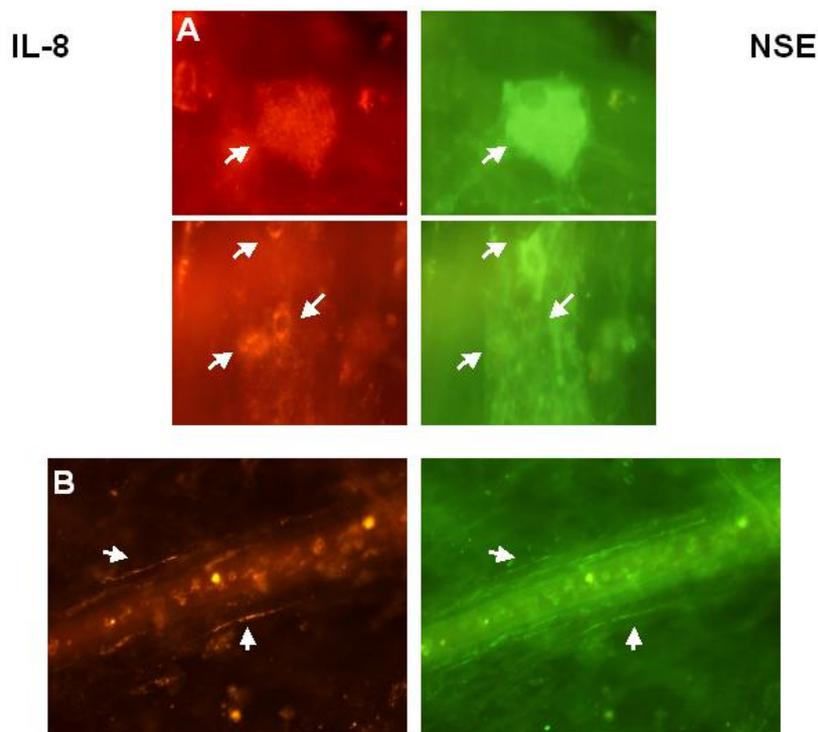
Les voies de signalisation MAP Kinases p38 et ERK1/2 sont impliquées dans la régulation par l'IL-1 $\beta$  de l'expression de l'IL-8 dans les neurones. Cependant, les inhibiteurs de ces deux voies n'ont pas bloqué toute la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$ , suggérant l'intervention d'autres voies de signalisation. Comme une voie dépendante de NF- $\kappa$ B a été associée à la régulation de l'expression de l'IL-8 dans plusieurs types cellulaires (Hoffmann, 2002), nous avons testé son rôle dans la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  dans les neurones. Les neurones NT2-N ont été prétraités avec 10  $\mu$ M d'acide cafféique phenyléthyl ester (CAPE), un inhibiteur de la voie dépendante de NF- $\kappa$ B, pendant 30 minutes avant l'ajout de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL). Après 6 heures d'incubation, l'IL-8 a été dosée dans le surnageant. Les résultats (figure 24) montrent que CAPE a réduit de manière significative l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$ . Ces résultats suggèrent que l'IL-1 $\beta$  régule la sécrétion d'IL-8 par une voie dépendante de NF- $\kappa$ B.



**Figure 24. CAPE diminue significativement la sécrétion d'IL-8 induite par l'IL-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N.** Les résultats sont normalisés par rapport à la sécrétion obtenue sans IL-1 $\beta$ . (n=3, moyenne $\pm$ ES, test t pairé, \*p=0,019).

### Etude de l'expression de l'IL-8 dans le plexus myentérique au cours de la rectocolite hémorragique.

Nous avons recherché une éventuelle expression de l'IL-8 dans les neurones au cours des MICI, pathologies dans lesquelles l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 a été largement décrite (MacDermott, 1999). Le plexus myentérique d'un patient atteint de rectocolite hémorragique a été disséqué et marqué par un anticorps souris anti-IL-8 et un anticorps lapin anti-Neurone Specific Enolase (NSE). Le marquage IL-8 a été révélé par un anticorps Cy3 anti-souris et le marquage NSE par un anticorps FITC anti-lapin. L'expression de l'IL-8 a été détectée dans des neurones et des fibres nerveuses entourant en particulier des vaisseaux sanguins (figure 25).



**Figure 25. Expression de l'IL-8 dans le plexus myentérique d'un patient atteint de rectocolite hémorragique.** L'expression de l'IL-8 a été détectée dans des structures des ganglions, en particulier dans les neurones (A, flèches) et dans des fibres nerveuses situées de part et d'autre d'un vaisseau sanguin (B, flèches). (IL-8 : orange ; NSE : vert ; grossissement x400).

## **- ARTICLE 2 -**

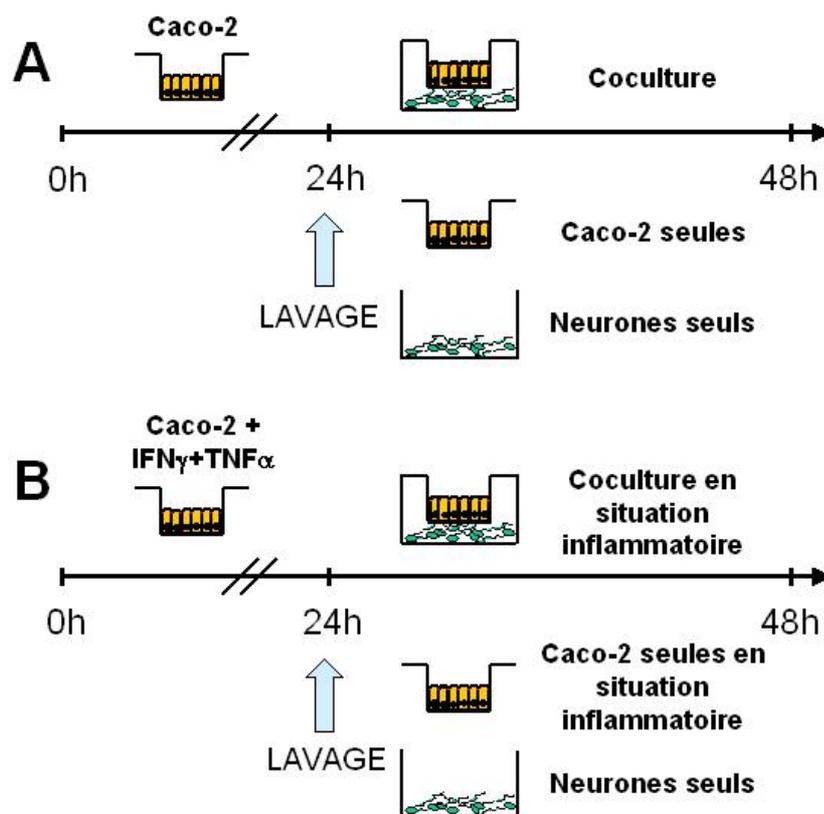
**Des interactions neuro-épithéliales régulent l'expression des ARNm et la sécrétion d'IL-8 par les neurones au cours de l'inflammation.**

## II- Des interactions neuro-épithéliales régulent l'expression des ARNm et la sécrétion d'IL-8 par les neurones au cours de l'inflammation.

L'étude précédente a montré que des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse intestinales humaines modulent l'expression de l'IL-8 dans les neurones sous-muqueux. Cependant, bien que des interactions bidirectionnelles aient été identifiées entre le SNE et les cellules épithéliales intestinales (CEI) (Sharkey et Mawe, 2002 ; Neunlist et coll, 2003a), l'implication d'interactions directe entre les CEI et les neurones, au cours de l'inflammation, n'a jamais été décrite. De plus, bien qu'une augmentation de l'immunoréactivité ait été observée dans les neurones entériques humains suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*, l'implication directe d'interactions neuro-épithéliales dans l'expression et la sécrétion d'IL-8 dans les neurones est inconnue. Par ailleurs, l'IL-8 est une chimiokine clé de la réponse inflammatoire intestinale impliquée dans le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes vers le site de l'infection ou de l'inflammation (Baggiolini et coll., 1989 ; Larsen et coll., 1989). De plus, lors de certaines pathologies intestinales, la présence d'infiltrats inflammatoires a été rapportée au niveau des ganglions entériques (De Giorgio et coll., 2004). Néanmoins, la capacité des neurones humains à induire le chimiotactisme de cellules immunitaires, et en particulier *via* la production de chimiokines, est inconnue.

Dans un premier temps, cette étude a été basée sur l'utilisation d'un modèle de coculture plus réductionniste que le précédent. Ce modèle est composé de CEI (lignée Caco-2) et de neurones (lignée NT2-N ou SH-SY5Y) permettant l'étude des interactions neuro-épithéliales (figure 26 A). Il permet (1) d'étudier les interactions entre deux types cellulaires, (2) de stimuler spécifiquement l'un ou l'autre des types cellulaires, (3) d'étudier la réponse spécifique d'un type cellulaire et (4) d'étudier l'implication de facteurs diffusibles. Les cellules Caco-2 sont traitées ou non avec un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  (cytomix) pendant

24 heures avant d'être soigneusement lavées et placées en coculture avec les neurones pendant 24 heures supplémentaires (figure 26B). De manière similaire à l'étude précédente, la sécrétion d'IL-8 est mesurée par ELISA dans le surnageant de la coculture, des Caco-2 cultivées seules et des neurones cultivés seuls (figure 26). L'expression des ARNm de l'IL-8 dans les neurones est de plus analysée par PCR en temps réel.

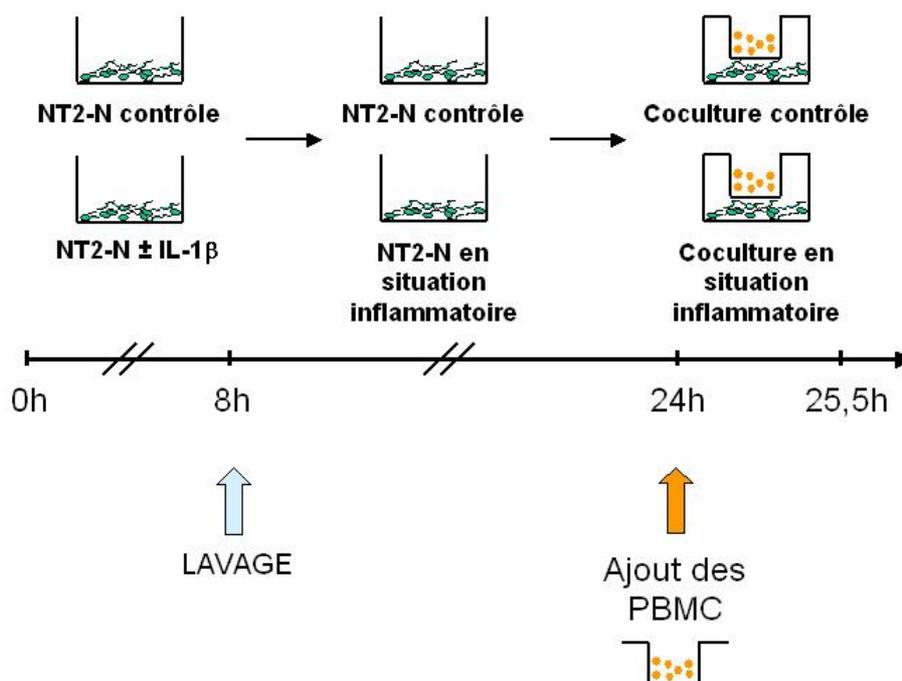


**Figure 26. Modèle d'étude des interactions neuro-épithéliales.**

L'utilisation de ce modèle a montré que des interactions neuro-épithéliales modulent la sécrétion d'IL-8 en réponse à une inflammation des Caco-2 par le cytomix. De plus, l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 en coculture est accompagnée d'une augmentation de l'expression des ARNm dans les neurones. Ces résultats ont été obtenus avec les deux lignées neuronales utilisées.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier le(s) médiateur(s) impliqué(s) dans ces effets. Dans l'étude précédente, nous avons montré que les effets de la toxine B du *C. difficile* sur l'expression d'IL-8 dans les neurones étaient dépendants de l'IL-1 $\beta$ , nous avons donc testé le rôle de l'IL-1 $\beta$  dans les interactions neuro-épithéliales. Le traitement avec le cytomix des Caco-2 a augmenté la sécrétion et l'expression des ARNm de l'IL-1 $\beta$  par les cellules Caco-2. De plus, l'IL-1ra a réduit l'augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-8 par les NT2-N et la sécrétion neuronale d'IL-8. Nos résultats suggèrent donc l'implication d'une voie dépendante de l'IL-1 $\beta$  dans l'augmentation de l'expression de l'IL-8 par les neurones en coculture. Cependant, l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 en coculture, soit la sécrétion globale d'IL-8 des Caco-2 et des NT2-N, n'est pas réduite par l'IL-1ra de manière significative, bien que réduite en moyenne. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs des voies MAP kinases p38 et ERK1/2 en coculture a de plus réduit l'augmentation de l'expression d'IL-8 dans les NT2-N et la sécrétion neuronale d'IL-8, confirmant le rôle joué par ces deux voies de signalisation dans la régulation de l'expression de l'IL-8 dans les neurones par l'IL-1 $\beta$ .

Enfin, nous avons recherché un rôle fonctionnel potentiel de la sécrétion de chimiokines par les neurones. L'IL-8 étant largement connue pour induire une réponse chimiotactique de cellules immunitaires, nous avons testé le rôle potentiel des neurones sur le chimiotactisme des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Pour ce faire, nous avons mis en place un modèle de coculture PBMC/neurones où les PBMC sont cultivés sur un filtre de 5 $\mu$ m de pores pour permettre leur passage vers le côté inférieur de la chambre occupé par les neurones (figure 27). Les neurones étaient préalablement traités ou non avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) puis soigneusement lavés avant d'être placés en coculture avec les PBMC.



**Figure 27. Modèle d'étude du chimiotactisme des PBMC induit par les NT2-N.**

L'analyse de la réponse chimiotactique des PBMC était basée sur deux paramètres : (1) le comptage du nombre de PBMC ayant migré du côté inférieur de la chambre et (2) le comptage du nombre de PBMC présentant une morphologie asymétrique parmi les PBMC ayant migré du côté inférieur de la chambre. L'utilisation de ce modèle a montré que les neurones prétraités à l'IL-1 $\beta$  induisent une réponse chimiotactique des PBMC, ce qui est partiellement bloqué en présence d'un anticorps neutralisant anti-IL-8.

En conclusion, cette étude montre que (1) des interactions neuro-épithéliales augmentent l'expression des ARNm de l'IL-8 et sa sécrétion par les neurones, (2) L'IL-1 $\beta$  est un médiateur de ces interactions et (3) l'inflammation des neurones induit le chimiotactisme de cellules immunitaires humaines *via* la sécrétion d'IL-8.

Cette étude a été soumise pour publication.

**Intestinal neuro-epithelial interactions modulate neuronal IL-8 expression and secretion in response to inflammation**

Emmanuelle Tixier (1), Jean-Paul Galmiche (2) and Michel Neunlist (1)

(1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U539, Hôpital Hôtel-Dieu, 44093 Nantes, France (2) Department of Gastroenterology and Hepatology, Hôpital Hôtel-Dieu, 44093 Nantes, France

Running Title: neuronal IL-8 regulation by epithelial inflammation

*Corresponding author:*

***Michel Neunlist, PhD***

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U539*

*Hôpital Hôtel-Dieu*

*44093 Nantes, France*

*tel: +(33) 2 40 08 75 15*

*fax: +(33) 2 40 08 75 06*

*E-mail: [michel.neunlist@univ-nantes.fr](mailto:michel.neunlist@univ-nantes.fr)*

**ABSTRACT**

Recent evidence suggests that, following intestinal inflammatory challenge, human enteric neurons can produce chemokines such as IL-8. However, whether direct neuro-epithelial interactions modulate neuronal IL-8 production is unknown. In addition, functional consequences of neuronal IL-8 production remain to be determined. Therefore this study aimed at investigating the role of neuro-epithelial interactions in the regulation of neuronal IL-8 production and determining the ability of neurons to induce chemotaxis of immune cells. Neuro-epithelial interactions were studied using a coculture model composed of intestinal epithelial cells (Caco-2), grown on porous filters, and human neuronal cells (NT2-N or SH-SY5Y). IL-8 secretion and mRNA expression were analyzed by ELISA and quantitative PCR, respectively. Pharmacological study was performed using IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and inhibitors of MAP kinases. Neuronally-induced chemotaxis was studied using a coculture model of NT2-N neurons and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), cultured on 5  $\mu$ m-pores filters. Following epithelial treatment with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , IL-8 secretion in coculture and neuronal IL-8 mRNA expression were significantly increased compared to control. Induction of IL-8 secretion and mRNA expression in NT2-N neurons were reduced using IL-1ra or inhibitors of p38 and ERK1/2 MAP kinases. IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N neurons induced chemotaxis of PBMC which was partly blocked by neutralizing anti-IL-8 antibody. Our results demonstrate that, under inflammatory conditions, neuro-epithelial interactions modulate neuronal IL-8 secretion and mRNA expression through IL-1 $\beta$ - and MAP kinases-dependent pathways. Furthermore, neuronally-induced chemotaxis may play a role in the generation of immune cells infiltrates observed during intestinal inflammation in enteric ganglia.

**Key words:** intestinal inflammation, epithelial cells, neurons, IL-8, chemotaxis.

**INTRODUCTION**

The enteric nervous system (ENS) is an integrative network located within the wall of the gastrointestinal tract. It is organized in ganglia, composed of neurons and glial cells. It consists of two major plexus, the submucosal and the myenteric plexus (46). There is mounting evidence for the involvement of the ENS in the intestinal inflammatory response to enteric pathogens or during chronic inflammation. In particular, the ENS has been described to be the target of inflammatory mediators, since electrophysiological behavior (21, 47) and neurochemical content (33) of enteric neurons are modified during intestinal inflammation. Furthermore, the ENS can directly secrete inflammatory mediators. For instance, during inflammatory conditions, rat enteric glial cells can secrete IL-6 (31), and human enteric neurons produce Interleukin(IL)-8 (38) and Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) (9). However, the cellular mechanisms leading to the regulation of chemokines production by neurons during intestinal inflammation, and in particular the role of intestinal epithelial cells (IEC), remain unknown.

During physiological conditions, the involvement of bidirectional interactions between intestinal epithelial cells (IEC) and neurons has been suggested by recent evidences. For instance, enteric neurons can regulate epithelial permeability (15, 24), proliferation (2, 40) and electrolytes secretion (7). In addition, enterochromaffin cells, a sensitive cell type located within the intestinal epithelial barrier, can modulate neuronal functions by the release of serotonin (36). Nevertheless, whether neuro-epithelial interactions modulate chemokines secretion during inflammatory processes remain unknown. Such direct interactions could however exist as interactions between the human intestinal mucosa and submucosa, have been identified both in presence or absence of mucosal infectious challenge (38). Furthermore, this study suggested the modulation of IL-8 production by enteric neurons during intestinal inflammation.

IL-8 is one of the key chemokines responsible for the recruitment of neutrophils or T lymphocytes to the site of inflammation or infection (1, 18). However, the functional consequences of chemokine secretion, such as IL-8, by neurons is largely unknown. In the ENS, chemokines secretion could be associated with the presence of inflammatory infiltrates within the submucosal or the myenteric plexus. For instance, dense lymphocytic infiltrates occur in patients with enteric inflammatory neuropathy, such as achalasia (13), chronic megacolon (10) or irritable bowel syndrome (39). It is, however, still unknown whether neurons are able to induce the chemotaxis of immune cells and whether neuronal IL-8 production is involved in this effect.

**Therefore, we developed a reductionnist coculture model to characterize the potential neuro-epithelial interactions regulating IL-8 neuronal secretion and mRNA expression in response to an inflammatory challenge of IEC with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . We also explored the potential chemotactic effect of neurons upon human immune cells under inflammatory conditions.**

## MATERIALS AND METHODS

### **Cell culture**

*Epithelial cell culture:* The Caco-2 human intestinal epithelial cell line (The European Collection of Cell Culture, Salisbury, United Kingdom) was grown on Transwell porous filters (12-well Transwell Clear, 0.40  $\mu\text{m}$  porosity, Costar, France). Cells (passage 87 to 121) were seeded at  $0.25 \times 10^6$  cells/well in DMEM (4.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose)/10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (all from Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and cultured until post-confluence. Experiments were conducted at days 8-10 after seeding in DMEM 10% heat inactivated FCS.

*Neuronal cells culture:* Human Ntera2/cl.D1 (NT2) fibroblast cells (LGC Promochem, Molsheim, France) were cultured and differentiated into neurons (NT2-N) as previously described (29). Cells (passage 23 to 45) were plated at a density of  $2 \times 10^6$  per  $75 \text{ cm}^2$  dishes in DMEM (4.5  $\text{g}/\text{L}$  glucose), 10% FCS, and 10  $\mu\text{M}$  all-trans retinoic acid (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) dissolved in DMSO (Sigma) and cultured for 5 weeks. Medium was changed twice a week. Cells were then replated at 1:6 and grown for 2 more days in the same medium without all-trans retinoic acid. Neuronal cells growing atop a monolayer of non-neuronal cells were dislodged with trypsin and plated in 12-well plates on Matrigel (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Cells were cultured in DMEM with 10% FCS supplemented with 1  $\mu\text{M}$  cytosine arabinoside, 10  $\mu\text{M}$  fluorodesoxyuridine, and 10  $\mu\text{M}$  uridine (Sigma) for an additional week. Experiments were performed in DMEM with 10% FCS.

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells (The European Collection of Cell Culture) were grown in DMEM/Ham-F12 (Invitrogen) with 10% FCS. In order to induce differentiation,  $0.5 \times 10^6$  cells (passage 17 to 25) were seeded in 12-well plates and treated with

10  $\mu$ M all-trans retinoic acid every two days for a week. Experiments were performed in DMEM/Ham-F12 with 10% FCS.

*Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation:* PBMC were isolated from EDTA-blood of healthy volunteers. 10 mL EDTA-blood were diluted with 20 mL RPMI 1640 medium (Invitrogen) and underlayered to 15 mL Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Orsay, France) and the gradient was centrifuged at 400g for 20 minutes at room temperature. The PBMC appeared as a dense white band above the red blood cells and granulocytes layer. This white band was removed and washed three fold with RPMI 1640 medium. Experiments were performed in RPMI 1640 with 10% heat inactivated FCS.

*Coculture model for the study of neuro-epithelial interactions*

In order to characterize interactions between IEC and neurons, we developed a coculture model, including IEC cultured on Transwell filter and neurons. One porous filter containing Caco-2, cultured at confluence, was placed above NT2-N cells or differentiated SH-SY5Y cells cultured in 12-well plate, and cocultured for 24 hours (Figure 1A). In addition, Caco-2 cells and NT2-N cells or differentiated SH-SY5Y cells were cultured separately for 24 hours to assess their individual response.

In order to explore neuro-epithelial interactions in response to an inflammatory challenge, Caco-2 cells were first treated with a mix of IFN- $\gamma$  (100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; AbCys, Paris, France) and TNF- $\alpha$  (10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; AbCys) for 24 hours prior to coculture with neurons (Figure 1B). After this 24-hour incubation Caco-2 cells were thoroughly washed four times in fresh culture medium. Inflamed Caco-2 cells and NT2-N cells or differentiated SH-SY5Y cells were then either cocultured or cultured alone for 24 hours (Figure 1B). This 24-hour incubation time was chosen since no effects upon IL-8 mRNA expression in neurons was

detected at earlier times of coculture (6 and 12 hours). At the end of the experiments, the supernatant was removed and stored at -80°C, and total mRNA was extracted from cells using tri Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

*Study of neuro-epithelial interactions*

In order to identify neuro-epithelial interactions, we compared the level of IL-8 secreted by Caco-2 and neuronal cells cultured alone with that obtained when Caco-2 and neuronal cells were cultured together. IL-8 secretion of Caco-2 and neuronal cells cultured alone was measured and the sum of these secretions was calculated. The sum of the IL-8 secretion of Caco-2 (IL-8<sub>IEC</sub>) and neuronal cells (IL-8<sub>neurons</sub>) cultured alone was then compared to the IL-8 secretion measured in coculture. In addition, IL-8 secretion measured in coculture was normalized to the sum of the IL-8 secretion of the Caco-2 and neuronal cells cultured alone as follows:

$$\Delta = 100 \times ((\mathbf{IL-8_c} - \mathbf{Sum\ IL-8_a}) / \mathbf{Sum\ IL-8_a})$$

where,  $\Delta$  is the variation of IL-8 secretion

**IL-8<sub>c</sub>** is the IL-8 secretion measured in coculture

**Sum IL-8<sub>a</sub>** is the sum of the IL-8 secretion of Caco-2 and neuronal cells cultured alone (IL-8<sub>IEC</sub>+IL-8<sub>neurons</sub>)

## Coculture model for the study of PBMC chemotaxis

As described in Figure 2, NT2-N cells were first treated (or not) with IL-1 $\beta$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 8 hours and washed with fresh culture medium in order to remove IL-1 $\beta$  in the

supernatant. IL-1 $\beta$ -pretreated and control NT2-N cells were then further cultured for 16 hours in fresh RPMI with 10% heat-inactivated FCS medium. Fresh isolated human PBMC were suspended and seeded at  $0.5 \times 10^6$  cells in a transwell chamber (5 $\mu$ m filter; 24-well Transwell Clear, Costar). The lower side of the chamber contained IL-1 $\beta$ -pretreated or control NT2-N cells (Figure 2). The chambers were incubated for 90 minutes in a humidified incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). At the end of the incubation, pictures of 15 fields (magnification x200) of the bottom of the chamber were acquired with a black and white video camera (4910 Cohu, SL Microtest, Jena, Germany) connected to a Macintosh computer via a frame-grabber card (Scion Image; SL Microtest). The chemotactic response of PBMC was quantified by 1) counting the number of PBMC in the bottom of the chamber (migrating PBMC) and 2) counting, among the PBMC in the bottom of the chamber, the number of PBMC which have a polarized morphology (polarized PBMC), which is typical of migrating PBMC (44).

#### *Pharmacological study*

Human recombinant IFN- $\gamma$  (100 u.mL<sup>-1</sup>; AbCys) and TNF- $\alpha$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>; AbCys) were used in this study. IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) (10 ng.mL<sup>-1</sup>; Tebu, Le Perray en Yvelines, France) was added to the medium of NT2-N cells 30 min prior to coculture with Caco-2 cells. NT2-N cells were preincubated for 30 min with the p38 inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M; Calbiochem, VWR, Strasbourg, France) and with the ERK1/2 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M; Calbiochem) prior to coculture with Caco-2 cells. Both inhibitors were used together, since we previously showed that maximal inhibition of IL-8 secretion was obtained under these conditions (38). A specific neutralizing anti-IL-8 antibody (10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, Diaclone, Besançon, France) and non specific mouse IgG (10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, Sigma) were also used. The concentration of neutralizing anti-IL-8 antibody was chosen as the concentration required to neutralize IL-8 amount in our culture conditions (assessed by ELISA, data not shown).

## Measurement of TER

The resistance of the IEC monolayer was measured using an EVOM resistance meter (World Precision Instruments, United Kingdom).

### *Measurement of IL-8 and IL-1 $\beta$ secretion*

Supernatants of cell cultures were collected. IL-8 or IL-1 $\beta$  protein levels were determined by ELISA (Becton Dickinson-Pharmingen, France) according to the manufacturer's instructions. Each sample was assessed in duplicate.

### *Analysis of IL-8 and IL-1 $\beta$ mRNA levels by real-time RT-PCR*

Total RNA was extracted from cells using tri Reagent (Euromedex) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1  $\mu$ g), random hexamers (0.5  $\mu$ g; Amersham, France), dNTPs (10 mM each; Invitrogen), and Rnasin (20 units, Promega, Madison, WI) were used to synthesize single-stranded cDNA using the Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase kit (200 units, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, in a total volume of 20  $\mu$ L. Amplification conditions for the IL-8, IL-1 $\beta$  and glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH) templates were optimized for the RotorGene 2000 instrument (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). PCRs were performed with 2  $\mu$ L of template (GAPDH cDNA was diluted at 1:10 and IL-8 and IL-1 $\beta$  cDNA was not diluted), 0.1  $\mu$ L of a solution of SYBR Green I diluted at 1:100 (Roche, Meylan, France), 10 pM of each primer, 0.25 mM dNTPs, and the Titanium Taq DNA polymerase kit (Clontech, Ozyme), according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: denaturation, 5 min at 95°C; amplification, 35 cycles including denaturation, 5 s at 95°C, annealing, 15 s at 62°C for

GAPDH, 63 °C for IL-8, and 68 °C for IL-1 $\beta$ , and extension, 20 s at 72°C and 15 s at 89°C for GAPDH, 83°C for IL-8 and 87 °C for IL-1 $\beta$ . Primers were chosen on separate exons to amplify cDNA but not genomic DNA. The following primers were used: GAPDH forward 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'; GAPDH reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; IL-8 forward 5'-CTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3'; IL-8 reverse 5'-TATGCACTGACATCTAAGTTCTT-3'; IL-1 $\beta$  forward 5'-TGCCCGTCTTCCTGGGAGGG-3'; IL-1 $\beta$  reverse 5'-GGCTGGGGATTGGCCCTG-3'. An external standard curve was generated with serial dilutions of control cDNA, by plotting the relative amounts of these dilutions against the corresponding C<sub>t</sub> (threshold cycle) values. The amount of IL-8 and GAPDH was calculated from these standard curves using the RotorGene software (Ozyme). Samples were tested in triplicate and the average values were used for quantification. For each sample, the ratio between the relative amounts of IL-8 and GAPDH or IL-1 $\beta$  and GAPDH was calculated to compensate for variations in quantity or quality of starting mRNA as well as for differences in reverse transcriptase efficiency.

#### *Statistical analysis*

Values are given as mean  $\pm$  SE. Conditions were compared using a one-way analysis of variance for repeated measures for multiple comparisons, or using a paired Student's t-test. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ treatment induces an inflammatory response of Caco-2 cells*

After 24-hours treatment of Caco-2 cells with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , the transepithelial resistance was significantly decreased compared to control (n=19, p<0.001). Furthermore, under these conditions, IL-1 $\beta$  and IL-8 mRNA expression in Caco-2 cells were significantly increased compared to control (Figure 3A, n=4, p<0.05). A significant increase in IL-1 $\beta$  and IL-8 secretion by Caco-2 cells was also observed (Figure 3B n=4, p<0.05).

## **Neuro-epithelial interactions under non inflammatory conditions**

After 24 hours of culture, IL-8 secretion of Caco-2 cells and NT2-N cells was  $4.3\pm 0.9$  pg.mL<sup>-1</sup> and  $21.9\pm 5.9$  pg.mL<sup>-1</sup>, respectively. In coculture, IL-8 secretion was not significantly different to the sum of IL-8 secretion of Caco-2 cells and NT2-N cells cultured alone (n=17, p=0.744) (Figure 4, control condition).

### *Neuro-epithelial interactions under inflammatory conditions*

In order to determine whether an inflammatory challenge of Caco-2 cells modulates IL-8 expression, inflamed Caco-2 (maintained for 24 hours in presence of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) were placed in coculture with NT2-N cells for 24 hours. Under these conditions, IL-8 secretion was significantly increased by 29.7% compared to the sum of the IL-8 secretion of Caco-2 cells and NT2-N cells cultured alone (figure 4, inflamed condition). Furthermore, as shown in figure 5A, the variations between IL-8 secretion in coculture and the sum of the IL-8 secretion of Caco-2 cells and NT2-N cells cultured alone was significantly greater with inflamed Caco-2 cells than with control Caco-2 cells (n=16, p<0.001). In addition, a significant increase in IL-8 mRNA expression was observed in NT2-N cells cocultured with inflamed Caco-2 cells compared to NT2-N cells cocultured with control Caco-2 cells (Figure

5B, n=12, p<0.001). Similarly, coculture of inflamed Caco-2 cells with differentiated SH-SY5Y induced a significant increase of IL-8 secretion (Figure 6A, n=10, p=0.001) and of IL-8 mRNA expression in the SH-SY5Y cells compared to control (Figure 6B, n=5, p<0.05).

*IL-1 $\beta$  mediates the increase in neuronal IL-8 secretion and mRNA expression in NT2-N cells following coculture with inflamed Caco-2 cells.*

After 3 hours of preincubation of NT2-N cells with IL-1ra (10 ng.mL<sup>-1</sup>), inflamed Caco-2 cells were added in coculture. Under these conditions, the increase in IL-8 secretion induced by coculture was reduced but the difference was not statistically significant (Figure 7A, n=13, p=0.274). However, IL-8 mRNA expression in NT2-N cells cocultured with inflamed Caco-2 cells was significantly reduced by 72% with IL-1ra compared to without (Figure 7B, n=4, p=0.003). In order to assess whether this decrease in IL-8 mRNA in NT2-N cells leads to a reduction of IL-8 secretion by neurons, NT2-N cells were further cultured alone for 4 hours in fresh culture medium. Under these conditions IL-8 secretion by NT2-N cells was significantly reduced by 1.7-fold when NT2-N cells were previously cocultured with IL-1ra compared to without (Figure 7C, n=4, p<0.05).

### **p38 and ERK1/2 MAP kinases mediates the increase in neuronal IL-8 secretion and mRNA expression in NT2-N cells following coculture with inflamed Caco-2 cells.**

After 3 hours of preincubation of NT2-N cells with the p38 inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M) and the ERK1/2 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M), inflamed Caco-2 cells were added in coculture. Under these conditions, IL-8 secretion of the coculture was significantly decreased compared to inflamed coculture (Figure 8A, n=13, p<0.001). In addition, IL-8 mRNA

expression in NT2-N cells cocultured with inflamed Caco-2 cells was significantly reduced by 56% with both inhibitors compared to without (Figure 8B, n=4, p=0.003). In order to assess whether this decrease in IL-8 mRNA in NT2-N cells leads to a reduction in IL-8 secretion by neurons, NT2-N cells were further cultured alone for 4 hours in fresh culture medium. Under these conditions, IL-8 secretion by NT2-N was significantly reduced by 2.3-fold when NT2-N cells were previously cocultured with both inhibitors compared to without (Figure 8C, n=4, p<0.05).

*IL-8 secreted by IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N cells increase the number of migrating PBMC.*

In order to characterize the chemotactic properties of NT2-N cells, IL-1 $\beta$ -pretreated or control NT2-N cells were placed in coculture with human PBMC (Figure 2). After 90 minutes of incubation, the number of PBMC present in the bottom of the chamber (migrating PBMC) with control NT2-N cells was not significantly different to the number of migrating PBMC counted in absence of NT2-N cells (Figure 9C, n=10, p=0.807). In contrast, following IL-1 $\beta$ -pretreatment of NT2-N cells, we observed a significant 2.1-fold increase in the number of migrating PBMC with inflamed NT2-N cells compared to control NT2-N cells (Figure 9A-C, n=10, p<0.01). In addition, the majority of human PBMC present in the bottom of the chamber with inflamed NT2-N cells showed a morphology characteristic of polarized cells (Figure 9B). Quantitative analysis revealed a significant 1.8-fold increase in the percentage of polarized cells following coculture with inflamed NT2-N cells compared to control NT2-N or without NT2-N cells (Figure 9D, n=10, p<0.01). In addition, in the presence of a specific neutralizing anti-IL-8 antibody (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), the number of migrating PBMC and the percentage of polarized PBMC were significantly reduced by 56% and 17%, respectively (Figure 10, n=7, p<0.05). In the presence of a non specific mouse IgG, the number of

migrating PBMC and the percentage of polarized PBMC were not significantly modified (Figure 10, n=3).

## DISCUSSION

Our results, obtained with a reductionist coculture model of intestinal epithelial cells and neurons, show that neuro-epithelial interactions regulate IL-8 neuronal secretion and mRNA expression, in response to an inflammatory challenge of the intestinal epithelial cells. These interactions are reproduced by IL-1 $\beta$  and involve p38 and ERK1/2 MAP kinases intracellular pathways. Moreover, pretreated neurons with IL-1 $\beta$  induce a chemotactic response of human PBMC mediated in part via IL-8.

In this study, we developed and used a reductionist model to characterize the interactions between two major cellular components of the gut wall, i.e., the intestinal epithelial cells and neurons. Despite the lack of the organization of an integrative model, this reductionist model allowed us to assess the response of one specific component of the model. The intestinal epithelial cell line Caco-2 and two neuronal cell lines (NT2-N and differentiated SH-SY5Y) were used. Caco-2 is a largely-used cell line which presents the characteristic features of human differentiated intestinal epithelium. The two well-characterized neuronal cell lines NT2-N (29) and SH-SY5Y (26) were chosen since no method is currently available to isolate and maintain human enteric neurons in culture. In addition, similarly to human submucosal neurons, these two cell lines respond to IL-1 $\beta$  by increasing IL-8 production (38). This coculture model allowed us to assess the individual response of each cell types of the model, and to investigate how neuro-epithelial interactions are modified during an inflammatory challenge of intestinal epithelial cells. Caco-2 cells were preincubated with inflammatory mediators and thoroughly washed before coculture to avoid a putative direct action of the inflammatory challenge on neurons. In addition, because no cell/cell contact are present in this model, it allowed us to focus on the involvement of soluble factors in the regulation of the neuronal IL-8 secretion.

In order to investigate whether inflammatory conditions modulate neuro-epithelial interactions, Caco-2 cells were first challenged with an inflammatory stimulus composed of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . This mix induces both alterations in barrier resistance and an inflammatory response in Caco-2 cells characterized by an induction of chemokines secretion as previously described (17, 43, 41).

In the absence of inflammatory conditions, no change in IL-8 secretion was observed between IL-8 secretion in coculture and the sum of IL-8 secretion of intestinal epithelial cells and neurons cultured alone. This result is different to that observed with an organotypic coculture model using human mucosa and submucosa, where a downregulation of IL-8 secretion was observed in the absence of inflammatory conditions (38). This difference could be due in part to the fact that Caco-2 cells are not able to secrete the factors responsible for the downregulation of IL-8 secretion by mucosa/submucosa interactions, suggesting that other cell types contained in the mucosa, such as immune cells or fibroblasts, could be responsible for this effect.

When Caco-2 cells were challenged with a mix of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  prior to coculture, IL-8 secretion in coculture was greater than the sum of the IL-8 secretion of intestinal epithelial cells and neurons cultured alone. In addition, this effect was associated with an induction of IL-8 mRNA expression in neurons. This result, established in different models of human differentiated neuronal cells, suggests that neuro-epithelial interactions increase IL-8 neuronal mRNA expression and is consistent with our previous work showing that mucosa/submucosa interactions increase IL-8 secretion during inflammation induced by toxin B of *Clostridium difficile*. Indeed, such mucosal challenge leads to an increase in IL-8 protein expression in submucosal neurons (38).

Our study identified IL-1 $\beta$  as the likely mediator of the effect shown in coculture with inflamed Caco-2 cells upon neuronal IL-8 mRNA expression and secretion. Indeed, IFN- $\gamma$ -

and TNF- $\alpha$ -treatment induce IL-1 $\beta$  secretion by Caco-2 cells, which is consistent with a previous study showing the increase in IL-1 $\beta$  secretion by Caco-2 cells in response to TNF- $\alpha$  (5). In addition, the induction of IL-8 mRNA expression and secretion in neurons after coculture with inflamed intestinal epithelial cells was reduced by IL-1ra. IL-1 $\beta$  has already been involved in the modulation of IL-8 secretion during inflammatory processes in human. Indeed, interactions between human intestinal mucosa and submucosa was found to be mediated via IL-1 $\beta$  when the mucosa was challenged with toxin B of *Clostridium difficile* (38). Moreover, IL-1 $\beta$  has already been shown to induce IL-8 mRNA expression in NT2-N cells and differentiated SH-SY5Y (38, 6, 3). Nevertheless, IL-8 secretion in the coculture was not abolished with IL-1ra for every experiments although it was numerically (but not statistically) reduced. This could be due to the involvement of another mediator targeting intestinal epithelial cells, such as TNF- $\alpha$ , which has been shown to be secreted by Caco-2 cells following inflammatory challenge (unpublished results, n=3) and also induces IL-8 secretion by intestinal epithelial cells (16). Our results also showed that p38 and ERK1/2 MAP kinases pathways are involved in the regulation of neuro-epithelial interactions controlling IL-8 secretion in coculture. These findings are consistent with previous studies showing that these two MAP kinases pathways are involved in the regulation of IL-8 production both in neuronal and epithelial cells (38, 16, 27, 11).

In a second part of the study, we aimed at characterizing a potential functional consequence of chemokines secretion by neurons. We showed that neurons are able to induce the chemotaxis of human immune cells, since following IL-1 $\beta$  pretreatment, NT2-N cells induced a migratory response of human PBMC. Neurons of the central nervous system have already been shown to induce the migration of immune cells via the release of chemokines. For instance, after exposure to the prion, neurons secrete RANTES, which activates the migration of microglia cells (23). In addition, infection by Measles virus results in

chemokines expression, such as RANTES and IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 (IP-10), by neurons and to the infiltration of T lymphocytes within the central nervous system. This infiltration can be partly blocked with neutralizing antibody directed against these chemokines (28). Chemotaxis induced by components of the ENS could also occur in patients with achalasia (13), chronic megacolon (10) or irritable bowel syndrome (39). In these patients, dense lymphocytic infiltrates were observed confined to the submucosal and the myenteric plexus.

In the present study, we identified IL-8 as being partly responsible for the chemotactic property of neurons since it was partly blocked using a specific neutralizing anti-IL-8 antibody. IL-8 is largely known to induce the chemotaxis of human immune cells such as neutrophils (1), T lymphocytes (18, 42), B lymphocytes (34). Furthermore, our results showed that the neutralizing antibody did not fully inhibit the chemotactic response suggesting that other mediators might be involved. Potential candidate could be other chemokines such as Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), MIP-1 $\alpha$  or MIP-1 $\beta$  which are expressed and secreted by NT2-N cells (8, 14) and which are known to induce the chemotaxis of human PBMC (37, 32). Other potential candidates could be neuromediators, such as Substance P which is expressed in NT2-N cells (19), and which has been shown to induce the chemotaxis of human PBMC (35).

In conclusion, our results provide evidences that neuro-epithelial interactions directly modulate IL-8 mRNA expression and secretion in neurons in part via IL-1 $\beta$  and involved MAP kinases pathways. In addition, our results demonstrate the ability of neurons, during inflammatory conditions, to induce the chemotaxis of human immune cells, partly through IL-8 secretion. These data further supports the putative role of chemokines secretion by enteric neurons in the generation of inflammatory infiltrates located within enteric ganglia during several inflammatory disorders of the gastrointestinal tract.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philippe Aubert and Julien Chevalier for excellent technical support.

**REFERENCES**

1. **Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL.** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045-9, 1989.
2. **Bjerknes M, Cheng H.** Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci* 98:12497-502, 2001.
3. **Bossu P, Ruggiero P, Macchia G, Maurizi G, Bizzarri C, Neumann D, Tagliabue A, Boraschi D.** Interaction between interleukin-1 and ciliary neurotrophic factor in the regulation of neuroblastoma cell functions. *Eur Cytokine Netw* 8:367-74, 1997.
4. **Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE.** Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12:78-85, 2000.
5. **Chowers Y, Cahalon L, Lahav M, Schor H, Tal R, Bar-Meir S, Levite M.** Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF-alpha- and bacteria-induced IL-8 and IL-1 beta secretion from intestinal epithelial cells. *J Immunol* 165:2955-61, 2000.
6. **Chuluyan HE, Lang BJ, Yoshimura T, Kenney JS, Issekutz AC.** Chemokine production and adhesion molecule expression by neural cells exposed to IL-1, TNF alpha and interferon gamma. *Life Sci* 63:1939-52, 1998.
7. **Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ.** Activation of 5-HT1P receptors on submucosal afferents subsequently triggers VIP neurons and chloride secretion in the guinea-pig colon. *J Auton Nerv Syst.* 66:105-10, 1997.
8. **Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H, Kalyuzhny A, Lee VM, Wolf B, Doms RW, Kolson DL.** Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 97:591-600, 2000.
9. **De Giorgio R, Barbara G, Pulsatelli L, Stanghellini V, Dolzani P, Meliconi R, Mazzotta E, Benedikter M, Corradi F, Facchini A, Collins SM, Corinaldesi R.** Chemokine expression and lymphocytes subsets in patients with idiopathic myenteric ganglionitis. *Gastroenterology* 111:378-387a, 2000. (Abstract)
10. **De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Salvioli B, Tonini M, Velio P, Bassotti G, Corinaldesi R.** Clinical and morphofunctional features of idiopathic myenteric ganglionitis underlying severe intestinal motor dysfunction: a study of three cases. *Am J Gastroenterol* 97:2454-9, 2002.
11. **Garat C, Arend WP.** Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Cytokine* 23:31-40, 2003.
12. **Gillitzer R, Goebeler M.** Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513-21, 2001.
13. **Goldblum JR, Whyte RI, Orringer MB, Appelman HD.** Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens. *Am J Surg Pathol* 18:327-37, 1994.
14. **Guo CJ, Douglas SD, Lai JP, Pleasure DE, Li Y, Williams M, Bannerman P, Song L, Ho WZ.** Interleukin-1beta stimulates macrophage inflammatory protein-1alpha and -1beta expression in human neuronal cells (NT2-N). *J Neurochem* 84:997-1005, 2003.
15. **Hallgren A, Flemstrom G, Nylander O.** Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* 275:G95-103, 1998.
16. **Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG.** MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C31-41, 2002.
17. **Kim JM, Kim JS, Jun HC, Oh YK, Song IS, Kim CY.** Differential expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile*

toxin A. *Microbiol Immunol* 46:333-42, 2002.

18. **Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K.** The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464-6, 1989.

19. **Li Y, Douglas SD, Pleasure DE, Lai J, Guo C, Bannerman P, Williams M, Ho W.** Human neuronal cells (NT2-N) express functional substance P and neurokinin-1 receptor coupled to MIP-1 beta expression. *J Neurosci Res* 74:559-66, 2003.

20. **Limatola C, Ciotti MT, Mercanti D, Vacca F, Ragozzino D, Giovannelli A, Santoni A, Eusebi F, Miledi R.** The chemokine growth-related gene product beta protects rat cerebellar granule cells from apoptotic cell death through alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. *Proc Natl Acad Sci* 97:6197-201, 2000.

21. **Linden DR, Sharkey KA, Ho W, Mawe GM.** Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* 15:191-205, 2004.

22. **Lu M, Grove EA, Miller RJ.** Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 99:7090-5, 2002.

23. **Marella M, Chabry J.** Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620-7, 2004.

24. **Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A.** Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1028-36, 2003.

25. **Ni HT, Hu S, Sheng WS, Olson JM, Cheeran MC, Chan AS, Lokensgard JR, Peterson PK.** High-level expression of functional chemokine receptor CXCR4 on human neural precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res* 152:159-69, 2004.

26. **Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T.** Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14:135-44, 1984.

27. **Parhar K, Ray A, Steinbrecher U, Nelson C, Salh B.** The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* 108:502-12, 2003.

28. **Patterson CE, Daley JK, Echols LA, Lane TE, Rall GF.** Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. *J Immunol* 171:3102-9, 2003.

29. **Pleasure SJ, Page C, Lee VM.** Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 12:1802-15, 1992.

30. **Reiss K, Mentlein R, Sievers J, Hartmann D.** Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 115:295-305, 2002.

31. **Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W.** Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 280:G1163-71, 2001.

32. **Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV.** Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177:1821-6, 1993.

33. **Schemann M, Neunlist M.** The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-9, 2004.

34. **Schratzberger P, Dunzendorfer S, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ.** Interleukin-8-induced human peripheral blood B-lymphocyte chemotaxis in vitro. *Immunol Lett* 58:167-70, 1997.
35. **Schratzberger P, Reinisch N, Proding WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Wiedermann CJ.** Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 158:3895-901, 1997a.
36. **Sharkey KA, Mawe GM.** Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2:669-77, 2002.
37. **Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ.** Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95:1370-6, 1995.
38. **Tixier E, Lalanne F, Just I, Galmiche JP and Neunlist M.** Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in IL-8 secretion. *Cell Microbiol*, 2005, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00596.x
39. **Tornblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B.** Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123:1972-9, 2002.
40. **Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A.** Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15:239-42, 2003.
41. **Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR.** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 166:409-19, 2005.
42. **Wang JM, Xu L, Murphy WJ, Taub DD, Chertov O.** IL-8-Induced T-Lymphocyte Migration: Direct as Well as Indirect Mechanisms. *Methods* 10:135-44, 1996.
43. **Warhurst AC, Hopkins SJ, Warhurst G.** Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 42:208-13, 1998.
44. **Wilkinson PC.** Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods* 216:139-53, 1998.
45. **Wilson AJ, Byron K, Gibson PR.** Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin Sci* 97:385-90, 1999.
46. **Wood JD.** Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 48:17-29, 1994.
47. **Xia Y, Hu HZ, Liu S, Ren J, Zafirov DH, Wood JD.** IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* 103:1309-16, 1999.
48. **Zhu Y, Yu T, Zhang XC, Nagasawa T, Wu JY, Rao Y.** Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* 5:719-20, 2002.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Schematic representation of the coculture model used for the study of neuro-epithelial interactions. The Caco-2 intestinal epithelial cell line and the two differentiated neuronal cell lines (NT2-N or SH-SY5Y) were used. Caco-2 cells and neuronal cells were either cocultured or cultured alone (**A**). A similar protocol was performed following inflammation of Caco-2 cells by a combination of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (**B**)

**Figure 2.** Schematic representation of the coculture model used to study the chemotactic response of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) induced by neurons. The NT2-N neurons were first pretreated (or not) with IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 8 hours. NT2-N were then thoroughly washed and further cultured for 16 hours in fresh culture medium. At the end of the 16-hour incubation, NT2-N were placed for 90 minutes in coculture with isolated human PBMC.

**Figure 3.** IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce an inflammatory response in Caco-2. After 24 hours of incubation of caco-2 cells with IFN- $\gamma$  (100 u.mL<sup>-1</sup>) and TNF- $\alpha$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>), IL-1 $\beta$  and IL-8 mRNA expression and secretion were analyzed in Caco-2 by real time PCR and ELISA. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  increased significantly IL-1 $\beta$  and IL-8 mRNA expression (**A**) and secretion (**B**). Values represent Mean $\pm$ SE of 4 independent experiments (paired t test, \* p<0.05 compared to control).

**Figure 4.** Interactions between Caco-2 and NT2-N modulate IL-8 secretion following epithelial challenge with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . After 24 hours of culture, IL-8 secretion of Caco-2 cells (cultured alone), NT2-N cells (cultured alone) and coculture was assessed by ELISA.

IL-8 secretion of the coculture and the sum of IL-8 secretion of Caco-2 and NT2-N cultured alone were compared. In control conditions, IL-8 secretion in coculture was not statistically different to the sum of IL-8 secretion of Caco-2 and NT2-N cultured alone (control, n=16, p=0.744 compared to the sum of Caco-2 and NT2-N cultured alone). When Caco-2 cells were pretreated with IFN- $\gamma$  (100 u.mL<sup>-1</sup>) and TNF- $\alpha$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>) for 24 hours, IL-8 secretion in coculture was higher than the sum of IL-8 secretion of inflamed Caco-2 cells and neurons cultured alone (inflamed, n=16). Values represent means $\pm$ SE of independent experiments (paired t-test).

**Figure 5.** Neuro-epithelial regulation of IL-8 secretion is associated with an up-regulation of IL-8 mRNA expression in NT2-N neurons. After 24 hours of coculture, variations of IL-8 secretion were calculated for each set of experiments and IL-8 mRNA expression was analyzed in NT2-N cells. The variations, between IL-8 secretion obtained in coculture and the sum of the IL-8 secretion of Caco-2 and NT2-N cultured alone, were significantly greater with prior treatment of Caco-2 cells with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  than without (**A**). Individual values of independent experiments are represented (n=16, paired t-test, \* p<0.05 compared to control conditions). IL-8 mRNA level in NT2-N cocultured with inflamed Caco-2 cells was higher than IL-8 mRNA level in NT2-N cocultured with control Caco-2 cells (**B**). Values represent Mean $\pm$ SE of 12 independent experiments (paired t-test, \* p<0.05).

**Figure 6.** Interactions between Caco-2 cells and SH-SY5Y neurons modulate IL-8 secretion and mRNA expression following epithelial challenge with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . After 24 hours of culture, IL-8 secretion of the Caco-2 cells (cultured alone), SH-SY5Y cells (cultured alone) and coculture was assessed by ELISA and variations of IL-8 secretion were calculated. The variations, between IL-8 secretion obtained in coculture and the sum of the IL-8 secretion of

Caco-2 and SH-SY5Y cultured alone, were significantly greater with prior treatment of Caco-2 cells with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  than without. Individual values of independent experiments are represented (**A**; n=10, paired t-test, \* p<0.05 compared to control conditions). IL-8 mRNA level in differentiated SH-SY5Y cocultured with inflamed Caco-2 cells was higher than IL-8 mRNA level in differentiated SH-SY5Y cocultured with control Caco-2 cells (**B**). Values represent Mean $\pm$ SE of 5 independent experiments (paired t test, \* p<0.05).

**Figure 7.** Role of IL-1 $\beta$  in the neuro-epithelial regulation of neuronal IL-8 mRNA expression and secretion. IL-8 secretion in coculture was higher with inflamed Caco-2 cells than in control (not inflamed). This increase was numerically but not statistically reduced by IL-1ra (10 ng.mL<sup>-1</sup>) (**A**; n=13 independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, p=0.274 compared to the inflamed condition). IL-8 mRNA level in NT2-N neurons induced in coculture with inflamed Caco-2 was significantly reduced with IL-1ra. Results are normalized to the IL-8 mRNA level obtained in inflamed coculture (16.9 $\pm$ 5.6 arbitrary units) (**B**; n=4 independent experiments, paired t-test, \*\* p=0.003 compared to the inflamed condition). Following coculture with inflamed or control Caco-2, NT2-N neurons were further cultured alone in fresh culture medium. After 4 hours of culture, IL-8 secretion by NT2-N neurons was analyzed. Neuronal IL-8 secretion induced in coculture with inflamed Caco-2 was significantly blocked with IL-1ra (**C**; n=4 independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \* p<0.05 compared to the inflamed condition).

**Figure 8.** Role of p38 and ERK1/2 MAP kinases in the neuro-epithelial regulation of IL-8 mRNA expression and secretion. IL-8 secretion in coculture was higher with inflamed Caco-2 than in control (not inflamed). This increase was blocked by the specific p38 inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M) and the specific ERK1/2 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) (**A**; n=13

independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \*\*  $p < 0.005$  compared to the inflamed condition). In addition, IL-8 mRNA level in NT2-N induced by coculture with inflamed Caco-2 was significantly reduced with both inhibitors. Results are normalized to the IL-8 mRNA level obtained in inflamed coculture ( $16.9 \pm 5.6$  arbitrary units) (**B**;  $n=4$  independent experiments, paired t-test, \*\*  $p < 0.005$  compared to the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  condition). Following coculture with inflamed or control Caco-2, NT2-N were further cultured alone in fresh culture medium. After 4 hours of culture, IL-8 secretion by NT2-N cells was analyzed. Neuronal IL-8 secretion induced in coculture with inflamed Caco-2 cells was significantly blocked with both inhibitors (**C**;  $n=4$  independent experiments, one-way repeated measures ANOVA, \*  $p < 0.05$  compared to the inflamed condition).

**Figure 9.** Chemotaxis of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) induced by neurons. PBMC in Transwell filter were cocultured with NT2-N neurons seeded in the bottom of the chamber. The number of PBMC in the bottom of the chamber was significantly greater following coculture with IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N cells (**A**) than with control NT2-N cells (**B**). Quantitative analysis revealed a significant increase in the number of migrating PBMC in the IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N condition compared to the control NT2-N or to the culture medium control condition (**C**;  $n=10$ , paired t-test, \*  $p < 0.01$  compared to control NT2-N or culture medium control condition). Among PBMC migrated to the bottom side of the chamber, the number of PBMC presenting a polarized morphology was higher following coculture with IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N cells (**B**, arrows) than with control NT2-N cells (**A**, arrows). Quantitative analysis revealed a significant increase of the number of polarized PBMC with IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N compared to the control NT2-N condition or to the culture medium control condition (**D**;  $n=10$ , paired t-test, \*  $p < 0.01$  compared to control).

**Figure 10.** IL-1 $\beta$ -pretreated NT2-N cells induce the chemotaxis of human PBMC in part via IL-8. NT2-N cells and PBMC were cocultured with or without a neutralizing anti-IL-8 antibody. Under these conditions, the increase of the number of migrating PBMC (**A**) and the number of polarized PBMC was partly blocked (n=7, one-way repeated measures ANOVA, \* p<0.05 compared to IL-1 $\beta$  condition). Non specific mouse IgG (mIgG) did not modify the increase in the number of migrating PBMC (**A**) and the number of polarized PBMC (**B**) (n=3). Results are normalized to the control level of migrating PBMC (**A**, control condition: 167 $\pm$ 37.8 cells.mm<sup>-2</sup>, control anti-IL-8: 197 $\pm$ 39 cells.mm<sup>-2</sup> and control mIgG cells.mm<sup>-2</sup>: 116.9 $\pm$ 5.6) and to the control of polarized PBMC (**B**, control condition: 29.7 $\pm$ 4.1%, control anti-IL-8: 31.6 $\pm$ 5.5% and control mIgG: 39.6 $\pm$ 3.6%) with or without anti-IL-8 or mIgG.

FIGURES

Figure 1

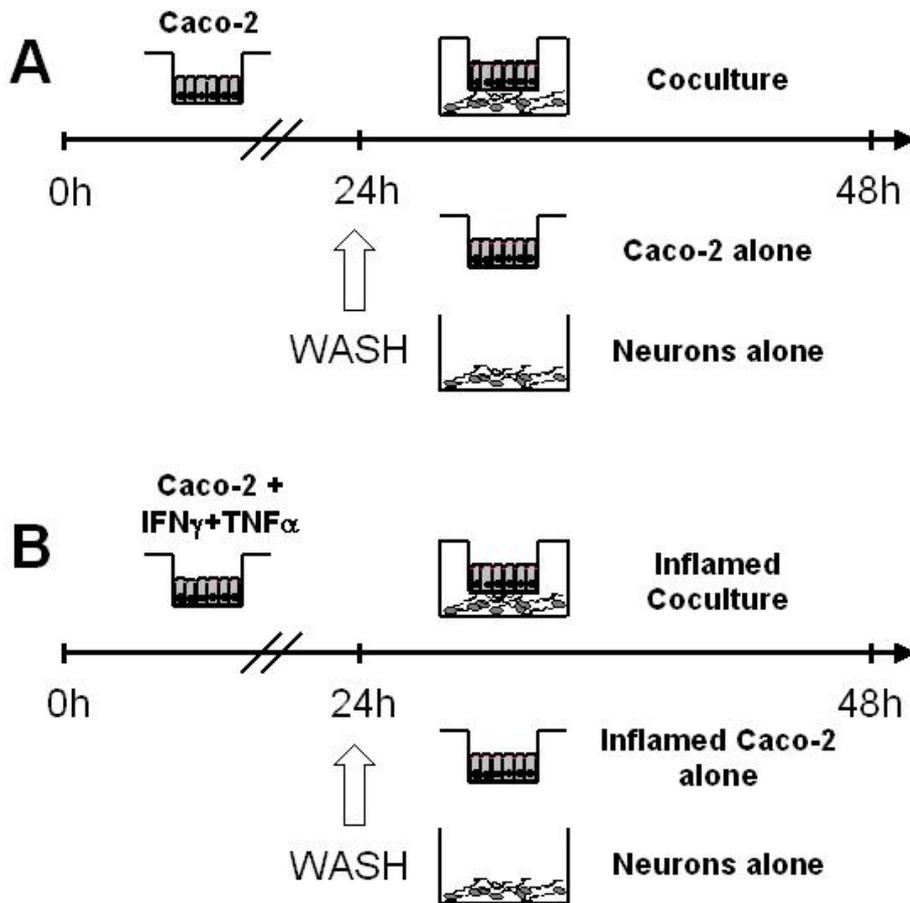


Figure 2

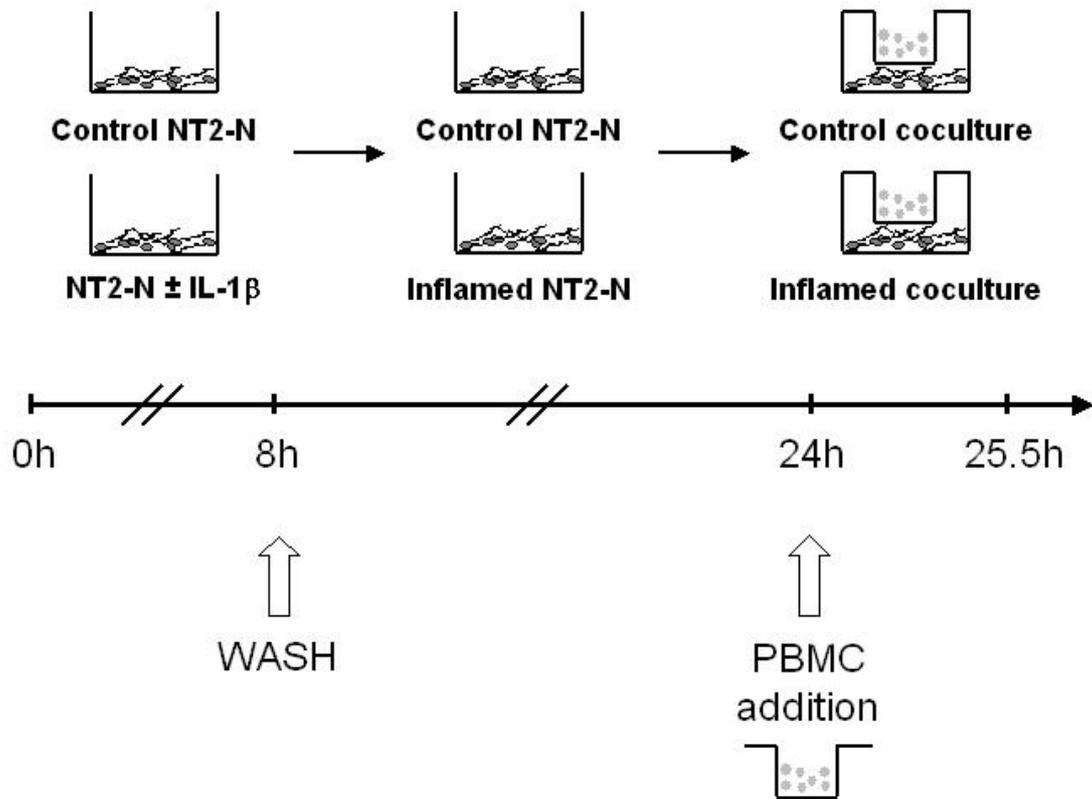


Figure 3

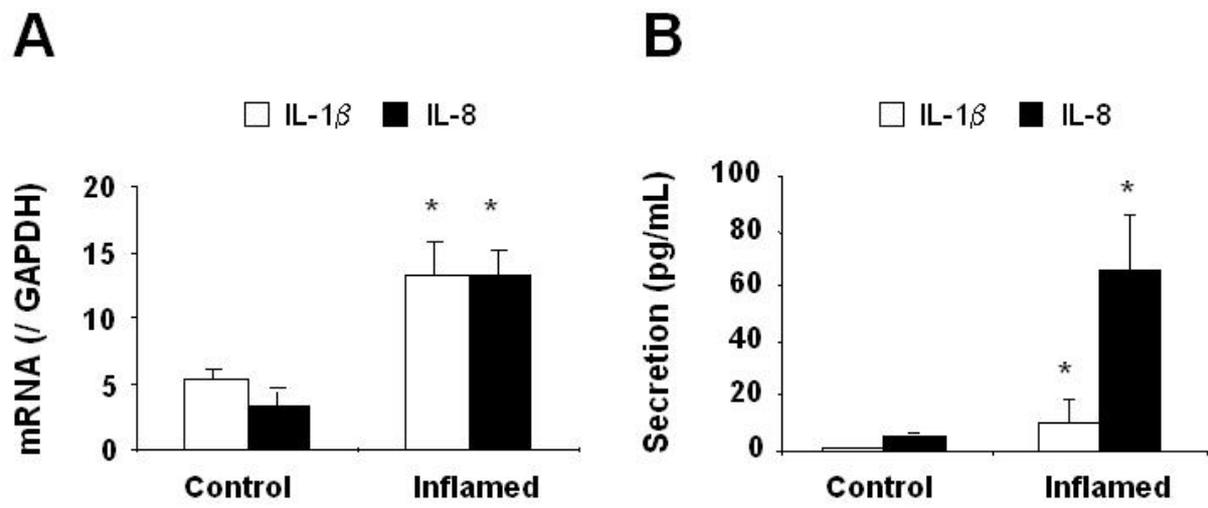


Figure 4

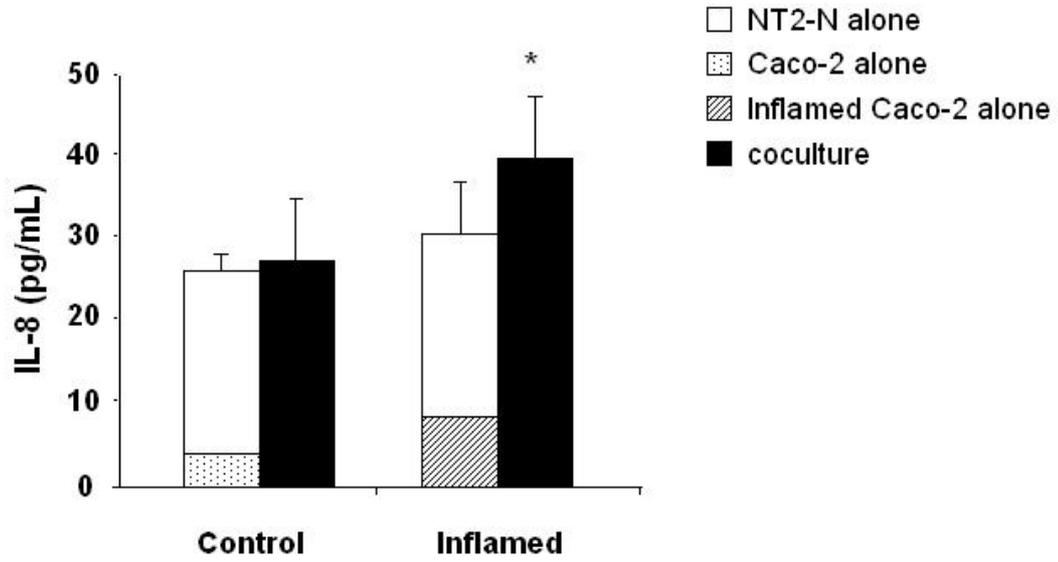


Figure 5

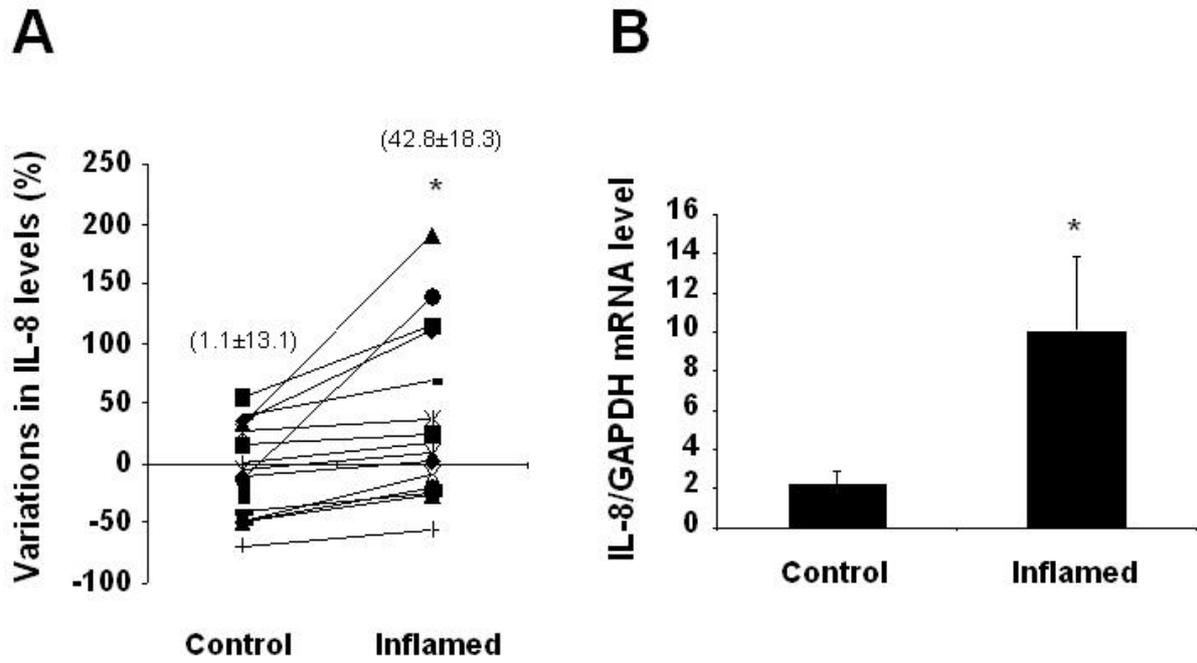


Figure 6

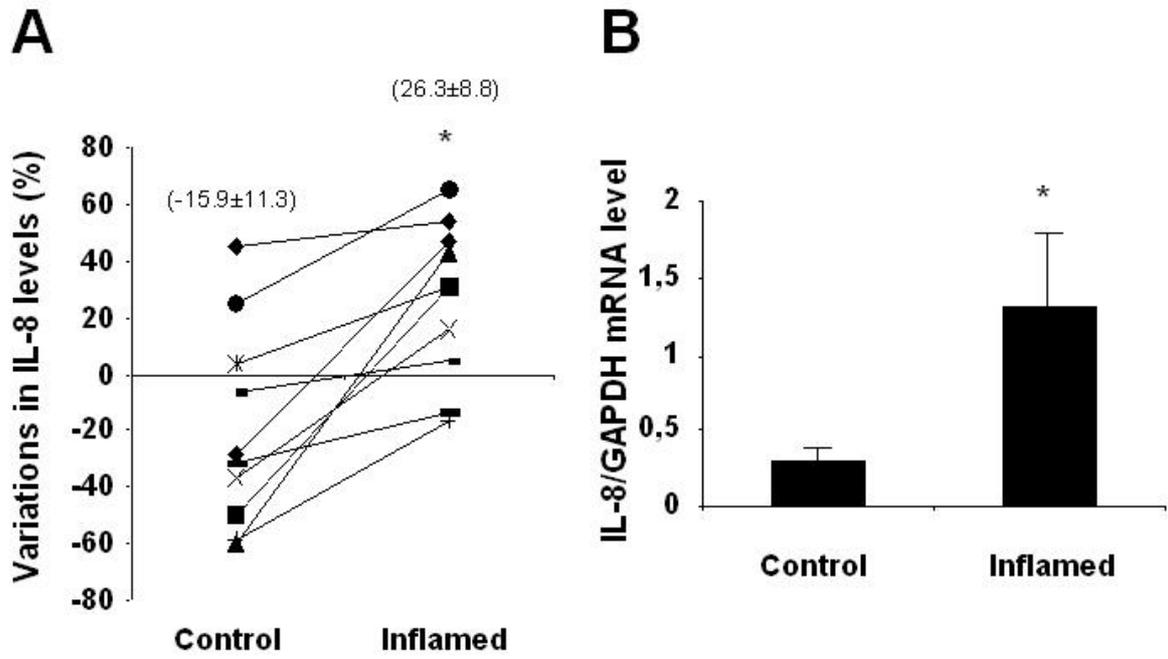


Figure 7

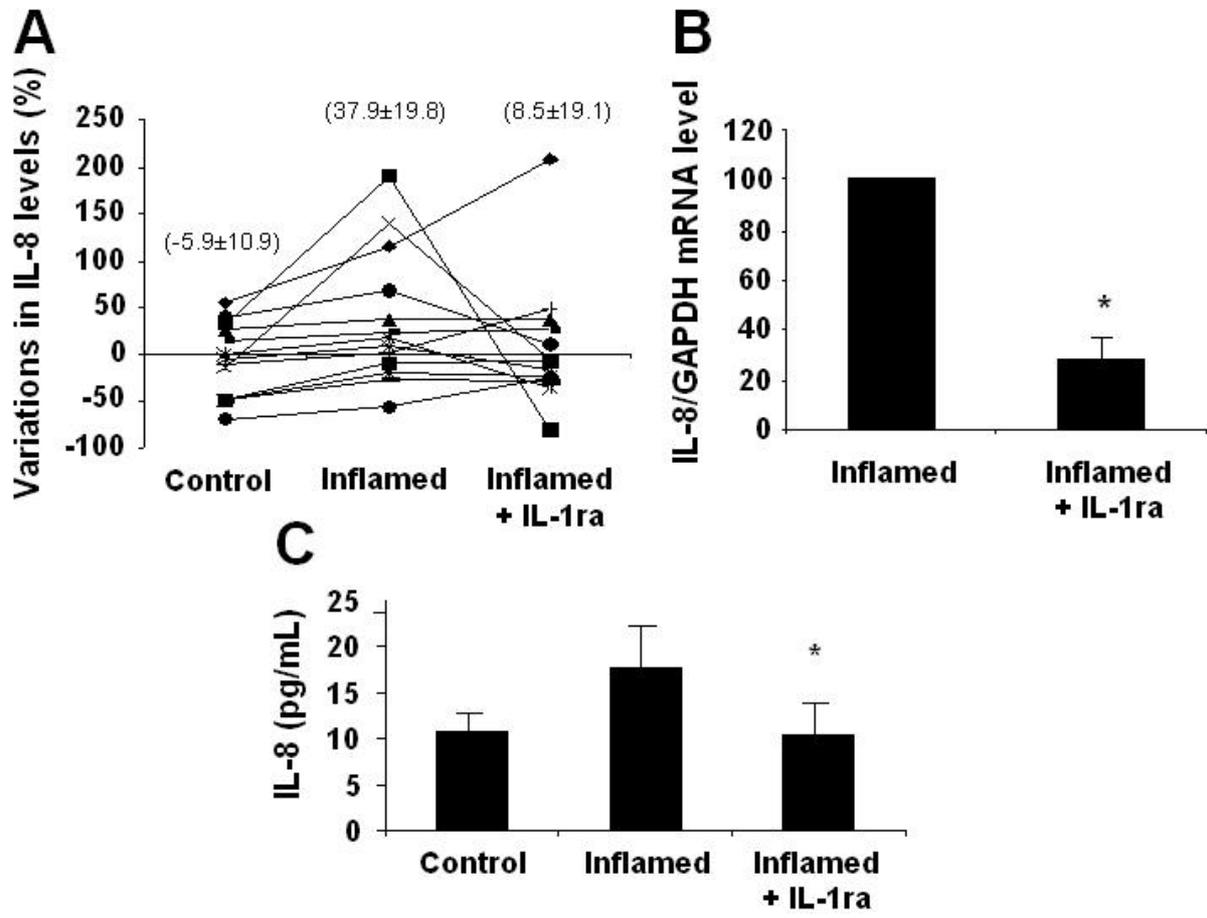


Figure 8

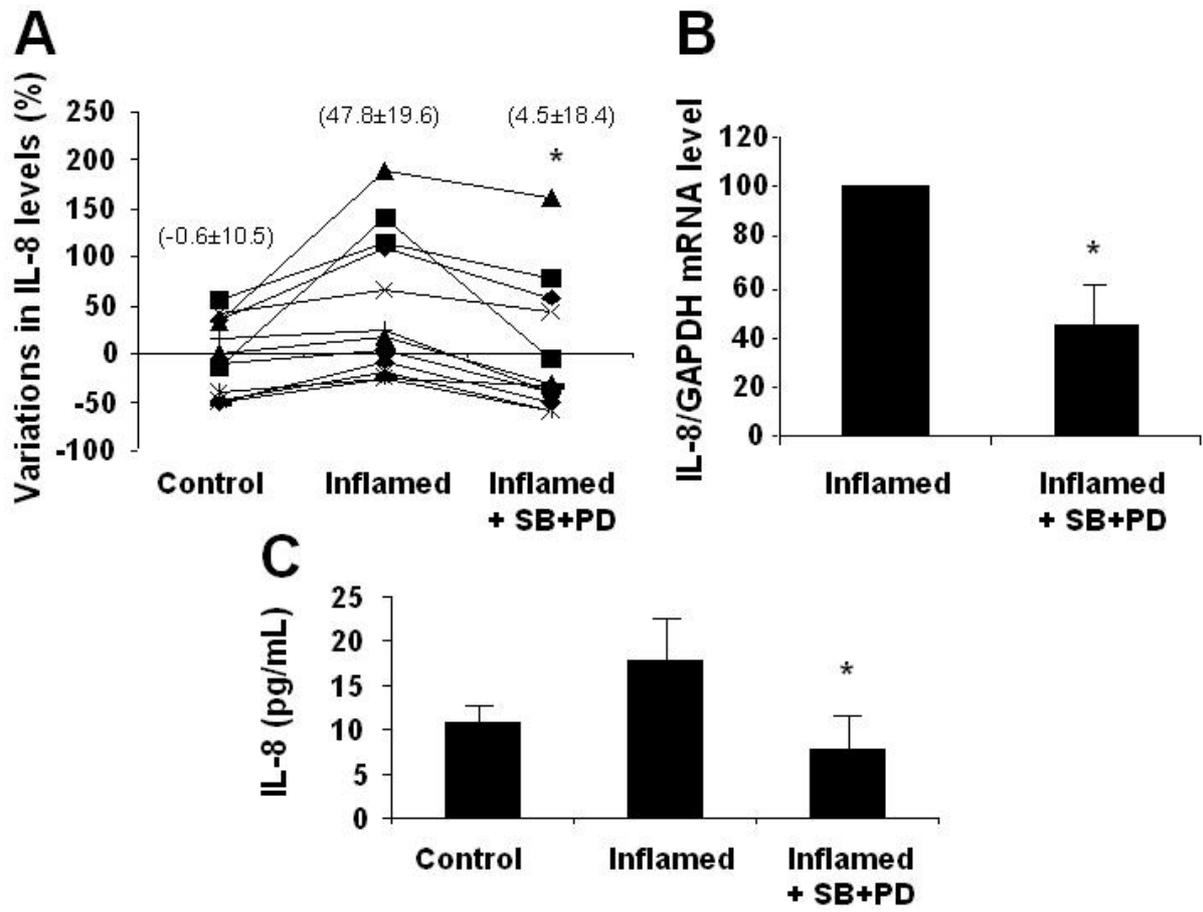


Figure 9

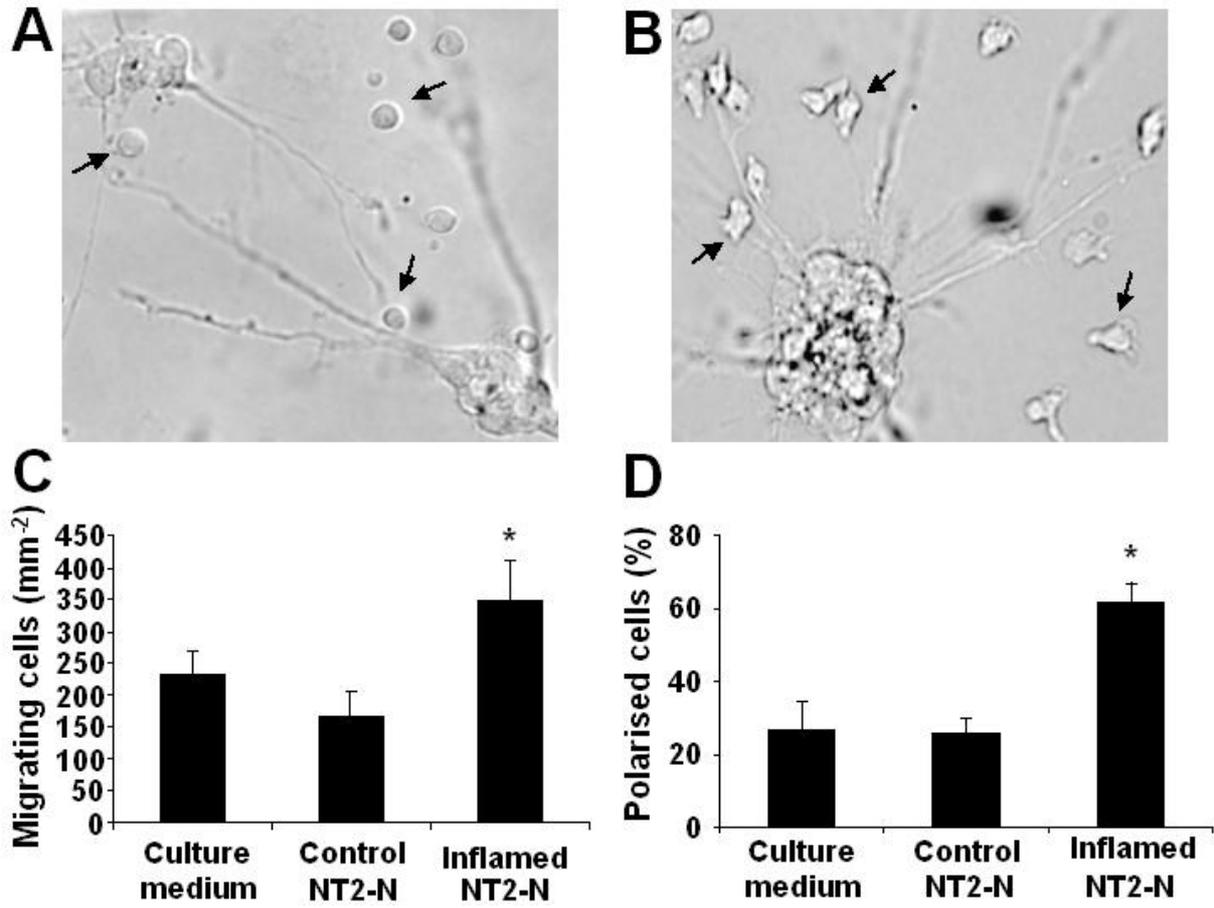
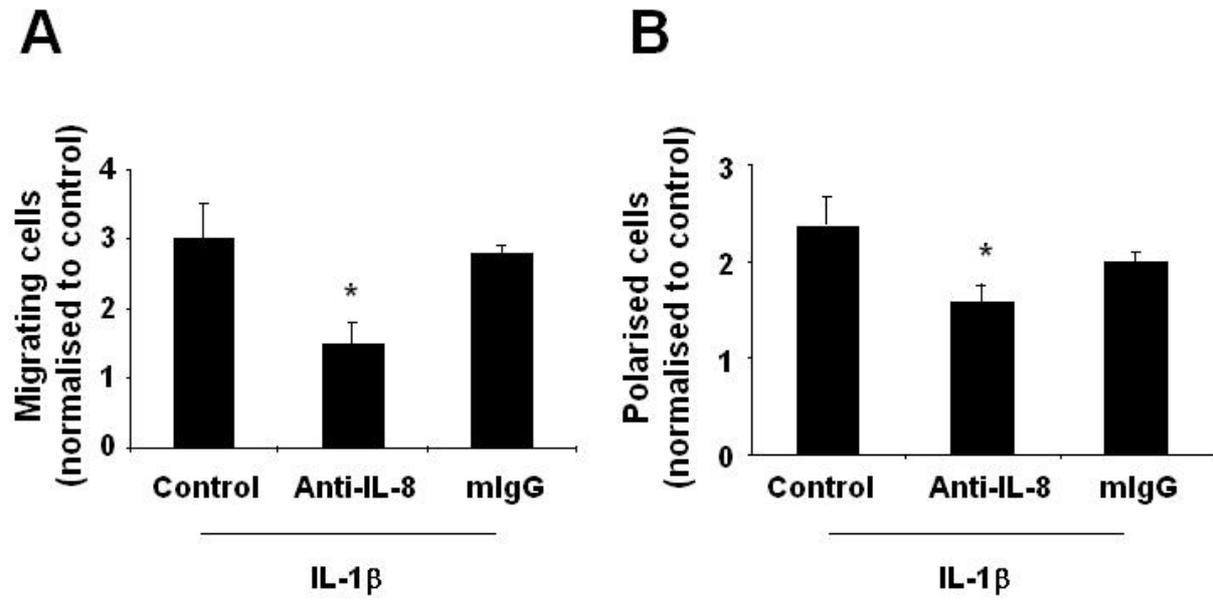


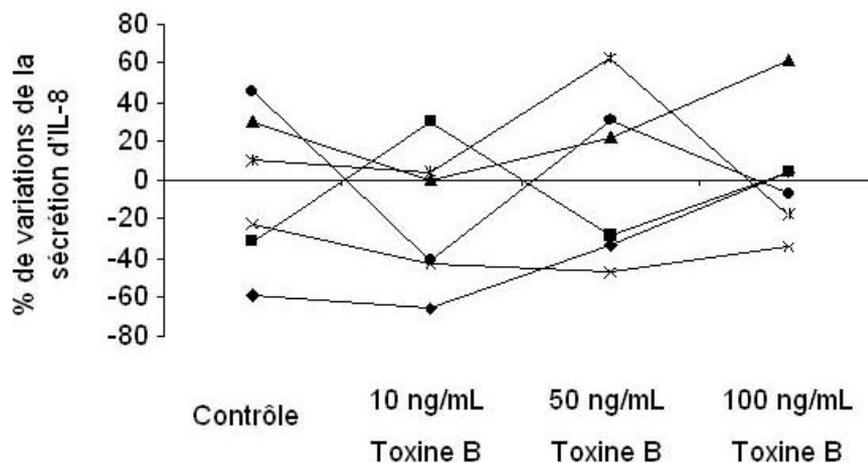
Figure 10





**Etude de l'implication d'interactions neuro-épithéliales dans la régulation de la  
sécrétion globale d'IL-8 lors de l'infection par la toxine B du *C. difficile*.**

Des interactions muqueuse/sous-muqueuse modulent la sécrétion globale d'IL-8 suite à l'inflammation de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile* (article 1). Dans le but d'étudier l'implication d'interactions neuro-épithéliales dans cet effet, nous avons traité les cellules Caco-2 avec différentes doses de toxine B du *C. difficile* avant d'être mises en coculture avec les cellules SH-SY5Y. A l'issue de la coculture, la sécrétion d'IL-8 a été dosée dans le surnageant de la coculture, des Caco-2 cultivées seules et des neurones cultivés seuls. Le pourcentage de variation de la sécrétion d'IL-8 a ensuite été calculé, et est présenté sur la figure 28. Ces résultats montrent que la sécrétion globale d'IL-8 n'est pas régulée par des interactions neuro-épithéliales lors de l'inflammation des Caco-2 par différentes doses de toxine B du *C. difficile*.



**Figure 28. Des interactions neuro-épithéliales ne modulent pas la sécrétion globale d'IL-8 lors de l'inflammation des Caco-2 avec différentes doses de toxine B du *C. difficile*. (n=6, ANOVA 1 pairée, p=0,614).**

## **- ARTICLE 3 -**

# **MANUSCRIPT EN PREPARATION**

**Les neurones expriment et sécrètent MIP-1 $\beta$  en réponse à l'inflammation de l'épithélium intestinal**

**III- Les neurones expriment et sécrètent MIP-1 $\beta$  en réponse à l'inflammation de l'épithélium intestinal**

### **INTRODUCTION**

Le système nerveux entérique (SNE) est un système nerveux intégratif organisé en deux plexus majeurs : le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique. Il est structuré en ganglions, composés de neurones et de cellules gliales. Au cours de processus physiologiques, l'existence d'interactions bidirectionnelles entre le SNE et la barrière épithéliale intestinale a été suggérée par quelques études récentes. Ainsi, des neurones sous-muqueux sont capables

de réguler les propriétés de l'épithélium digestif, telles que la prolifération, la perméabilité et la sécrétion d'électrolytes (Neunlist et coll., 2003a ; Toumi et coll., 2003 ; Cooke et coll., 1997). Réciproquement, les cellules entérochromaffines, des composantes majeures de la barrière épithéliale intestinale, peuvent moduler les propriétés électrophysiologiques des neurones entériques par la libération de sérotonine (Mawe et Sharkey, 2002). L'existence de telles interactions au cours de processus physiopathologiques a été peu décrite. Seule une étude récente a montré que des interactions entre les cellules épithéliales intestinales et les neurones modulent la sécrétion et l'expression des ARNm de l'IL-8 par les neurones en réponse à l'inflammation de l'épithélium (article 2). Néanmoins, l'implication d'interactions neuro-épithéliales dans la modulation de la sécrétion d'autres chimiokines est inconnue.

L'inflammation intestinale, d'origine chronique ou infectieuse, est caractérisée par la libération de médiateurs inflammatoires, parmi lesquels les chimiokines jouent un rôle majeur. Les chimiokines de la famille CXC, telles que l'IL-8, sont ainsi responsables du recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation tandis que celles du groupe CC, telles que MIP-1 $\beta$ , attirent préférentiellement les lymphocytes (Baggiolini et coll., 1999 ; Maurer et Von Stebut, 2004). Dans des formes particulières d'inflammation intestinale, des infiltrats inflammatoires, composés de neutrophiles ou de lymphocytes principalement, ont été observés au sein des ganglions entériques (Sanovic et coll., 1999 ; Linden et coll., 2005 ; De Giorgio et coll., 2004). Les mécanismes physiopathologiques conduisant à la formation de ces infiltrats sont inconnus. Cependant des études récentes suggèrent que la sécrétion de chimiokines par les neurones pourraient intervenir dans ces processus. Ainsi, les neurones entériques produisent de l'IL-8 au cours de processus inflammatoires (article 1). Par ailleurs, les neurones sont de plus capables d'induire le chimiotactisme de cellules immunitaires *via* la sécrétion d'IL-8 (article 2). Néanmoins, l'implication d'autres chimiokines, telles que MIP-1 $\beta$ , dans les propriétés chimiotactiques des neurones est inconnue.

C'est pourquoi, les objectifs de cette étude étaient de (1) caractériser les interactions neuro-épithéliales modulant l'expression des ARNm et la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les neurones, à l'aide d'un modèle de coculture réductionniste déjà utilisé, et (2) d'étudier le rôle de MIP-1 $\beta$  dans le chimiotactisme de cellules immunitaires induit par des neurones en conditions inflammatoires.

## **MATERIELS ET METHODES**

La plupart des « matériels et méthodes » utilisées dans cette étude sont identiques à ceux décrits dans l'article 2. Les quelques différences sont le kit de dosage ELISA de MIP-1 $\beta$  humain (Raybiotech, Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France), l'anticorps neutralisant anti-MIP-1 $\beta$  (R&D System, Lille, France) et les amorces permettant d'amplifier MIP-1 $\beta$  (sens : CCAAACCAAAGAAGCAAGC ; antisens : ACAGTGGACCATCCCCATAG ; température d'hybridation : 65 °C ; température d'acquisition : 86 °C).

## RESULTATS

### *Des interactions neuro-épithéliales diminuent la sécrétion de MIP-1 $\beta$ en situation contrôle*

A l'issue de 24 heures de culture, la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les NT2-N et les Caco-2 était respectivement de 6,2 $\pm$ 2,0 pg/mL et de 9,1 $\pm$ 1,8 pg/mL. En coculture, la sécrétion de MIP-1 $\beta$  était réduite de 13% par rapport à la somme des sécrétions de MIP-1 $\beta$  des Caco-2 et des NT2-N cultivées seules (figure 29 A, condition contrôle, n=10, p<0,05).

### *Des interactions neuro-épithéliales augmentent la sécrétion de MIP-1 $\beta$ en situation inflammatoire*

Les Caco-2 ont été soumises à un stimulus inflammatoire (traitement de 24 heures avec un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ ) afin de déterminer si les interactions neuro-épithéliales modulant la sécrétion de MIP-1 $\beta$  sont modifiées en situation inflammatoire. Après 24 heures de coculture avec les Caco-2 inflammatoires, la sécrétion de MIP-1 $\beta$  était augmentée de 15% par rapport à la somme des sécrétions de MIP-1 $\beta$  des Caco-2 inflammatoires et des NT2-N cultivées seules (figure 29 A, condition inflammatoire, n=10, p<0,05). Les variations de la sécrétion de MIP-1 $\beta$  entre la coculture et la somme des sécrétions des Caco-2 et des neurones cultivées seules étaient, de plus, supérieures avec les Caco-2 inflammatoires par rapport aux Caco-2 contrôle (figure 29 B, n=10, p<0,05).

### *Des interactions neuro-épithéliales augmentent l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$ dans les neurones NT2-N et SH-SY5Y en coculture avec les Caco-2 inflammatoires*

Lorsque les Caco-2 étaient placées en conditions inflammatoires, l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les NT2-N était augmentée de 14 fois par rapport au contrôle (figure 30 A, n=10, p<0,05). Dans ces mêmes conditions, l'expression de MIP-1 $\beta$  dans les cellules SH-SY5Y était augmentée de 3 fois par rapport au contrôle (figure 30 B, n=8, p<0,05).

*L'IL-1 $\beta$  est responsable de l'augmentation de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les neurones en coculture*

Les NT2-N étaient préincubées 3 heures avec de l'IL-1ra (10 ng/mL) avant d'être placées en coculture avec les Caco-2 en présence d'IL-1ra. Dans ces conditions, l'augmentation de la sécrétion de MIP-1 $\beta$  induite en coculture avec les Caco-2 inflammatoires était réduite numériquement mais non significativement (figure 31 A, n=7, p=0,282). L'augmentation de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  induite par la coculture avec les Caco-2 inflammatoires était quant à elle réduite de manière significative par l'IL-1ra (figure 31 B, n=4, p<0,05). A l'issue de la coculture, les NT2-N étaient cultivées seules 8 heures supplémentaires, afin de vérifier que la réduction de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  par l'IL-1ra s'accompagnait d'une baisse de la sécrétion neuronale de MIP-1 $\beta$ . Cependant, dans ces conditions, l'augmentation de la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les NT2-N induite en coculture avec les Caco-2 inflammatoires n'était pas réduite significativement par l'IL-1ra (figure 31 C, n=4, p=0,820). Néanmoins, l'IL-1 $\beta$  augmente de manière significative l'expression des ARNm et la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les NT2-N (figure 32, n=4, p<0,05).

*Les neurones NT2-N en situation inflammatoire induisent le chimiotactisme des PBMC par une voie ne dépendant pas de MIP-1 $\beta$*

Dans le but d'étudier les propriétés chimiotactiques des neurones, les NT2-N étaient prétraitées ou non avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) avant d'être placées en coculture avec les PBMC. Lorsque les NT2-N étaient en conditions inflammatoires, le nombre de PBMC migrant vers les NT2-N étaient de  $347 \pm 65$  cellules/mm<sup>2</sup> contre  $167 \pm 38$  cellules/mm<sup>2</sup> en situation contrôle (n=10). De plus, 61,7 $\pm$ 5,1% des cellules présentaient une morphologie asymétrique, caractéristique du chimiotactisme, lorsque les NT2-N étaient prétraités à l'IL-1 $\beta$ ,

contre  $29,7 \pm 4,1\%$  en condition contrôle (n=10). En présence d'un anticorps neutralisant anti-MIP-1 $\beta$ , le nombre de PBMC ayant migré vers les neurones et le pourcentage de cellules asymétriques n'étaient pas réduit de manière significative (figure 33, n=7).

## DISCUSSION

Nos résultats montrent que des interactions neuro-épithéliales diminuent la sécrétion de MIP-1 $\beta$  en dehors de condition inflammatoire et l'augmentent en réponse à l'inflammation de l'épithélium. Ce dernier effet s'accompagne d'une augmentation de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les neurones. L'IL-1 $\beta$  reproduit l'augmentation de la sécrétion et de l'expression de MIP-1 $\beta$  par les neurones. Par ailleurs, les propriétés chimiotactiques des neurones en conditions inflammatoires sur les PBMC semblent indépendants de MIP-1 $\beta$ .

Ces résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation d'un modèle réductionniste, identique à celui précédemment décrit (article 2). Il est composé d'une lignée de cellules épithéliales intestinales (Caco-2) et d'une lignée neuronale (NT2-N ou SH-SY5Y). Ce modèle ne présente pas les qualités d'un modèle intégré, mais permet d'étudier la réponse individuelle de l'une ou l'autre des composantes cellulaires du modèle ainsi que leur réponse globale. Ce modèle reproduit de plus les effets d'un modèle intégré composé de muqueuse et de sous-muqueuse humaine, concernant la modulation de la sécrétion d'IL-8 (article 1 ; article 2). Les Caco-2 étaient stimulées par un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  afin de déterminer si les interactions neuro-épithéliales modulant la sécrétion de MIP-1 $\beta$  sont modifiées par des conditions inflammatoires. Ce mélange de cytokines induit des altérations de la barrière épithéliale intestinale et une réponse inflammatoire caractérisée par la sécrétion de chimiokines (Kim et coll., 2002 ; Warhurst et coll., 1998 ; Wang et coll., 2005).

En dehors de condition inflammatoire, les interactions neuro-épithéliales conduisent à une diminution de la sécrétion globale de MIP-1 $\beta$ . Le TGF $\beta$  pourrait être responsable de cet

effet. Ce médiateur inhibe en effet la sécrétion de MIP-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N (Guo et coll., 1998). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-TGF $\beta$  dans ce modèle de coculture cellulaire.

En revanche, en réponse à l'inflammation des Caco-2 par un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$ , des interactions neuro-épithéliales augmentent la sécrétion globale de MIP-1 $\beta$ . Ce résultat est en accord avec des études antérieures montrant que des conditions inflammatoires, infectieuses ou chroniques, augmentent l'expression de MIP-1 $\beta$  dans des composantes cellulaires intestinales, telles que les cellules épithéliales (Lacroix-Lamandé et coll., 2002 ; Olsson et coll., 2000 ; Banks et coll., 2003). Notre étude montre de plus que l'augmentation de la sécrétion globale de MIP-1 $\beta$  s'accompagne d'une augmentation de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les neurones. Cette observation est cohérente avec nos précédents travaux montrant que des interactions entre la barrière épithéliale intestinale et les neurones entériques induisent l'expression de l'IL-8 dans les neurones en situation inflammatoire (article 1 ; article 2). Les neurones entériques expriment de plus MIP-1 $\alpha$ , une chimiokine de la même famille que MIP-1 $\beta$ , au cours de certains processus physiopathologiques, tel que la pseudo-obstruction intestinale chronique (De Giorgio et coll., 2000c).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier le médiateur impliqué dans les interactions neuro-épithéliales modulant la sécrétion et l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  par les neurones. Notre étude a identifié l'IL-1 $\beta$  comme un médiateur potentiel de l'induction de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les NT2-N en coculture avec les Caco-2 inflammatoires. L'IL-1 $\beta$  augmente de plus significativement la sécrétion et l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N. Ce résultat est en accord avec une étude précédente montrant cet effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression de MIP-1 $\beta$  dans les neurones NT2-N (Guo et coll., 2003). L'IL-1 $\beta$  joue également un rôle dans les interactions neuro-épithéliales

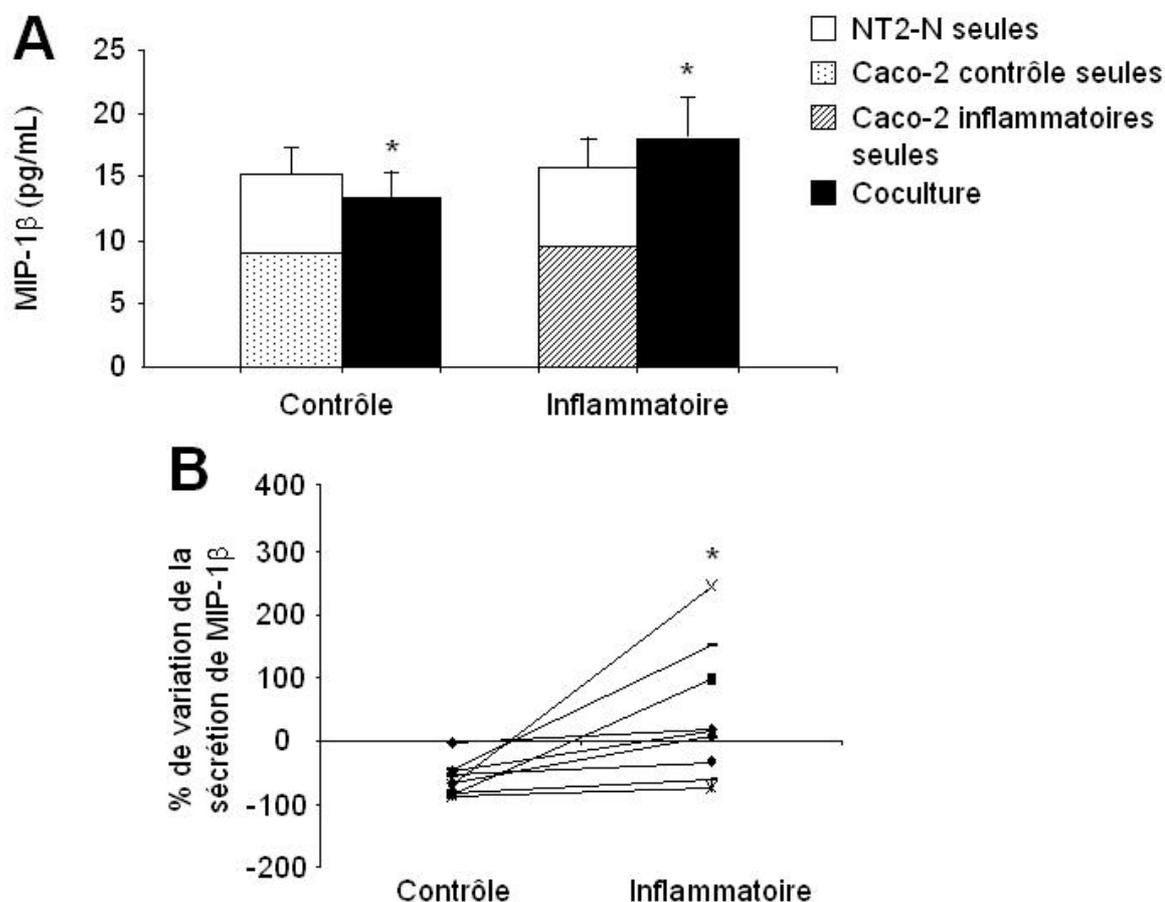
modulant l'expression de l'IL-8 dans les neurones en situation inflammatoire (article 2). Cependant, la sécrétion globale et neuronale de MIP-1 $\beta$  induite en coculture avec les Caco-2 inflammatoires n'a pas été réduite par l'IL-1ra de manière significative. Cette observation suggère l'implication d'autres médiateurs dans ces effets. Le TNF $\alpha$  peut être un candidat potentiel. Les Caco-2 le sécrètent en effet en réponse à un stimulus inflammatoire (résultats non publiés, n=3) et ce médiateur est capable d'induire la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les NT2-N (Guo et coll., 2003). Un complément de cette étude pourrait être d'étudier les effets d'un anticorps neutralisant anti-TNF $\alpha$  dans ce modèle.

Enfin, un des objectifs de cette étude était de rechercher un rôle fonctionnel de la sécrétion de MIP-1 $\beta$  dans le modèle d'étude du chimiotactisme des PBMC induit par les NT2-N. Notre étude précédente avait montré que les neurones prétraités à l'IL-1 $\beta$  induisent le chimiotactisme des PBMC partiellement *via* la sécrétion d'IL-8 (article 2). Nos résultats ne permettent pas ici d'incriminer MIP-1 $\beta$  dans le pouvoir chimiotactique des neurones, car l'anticorps neutralisant anti-MIP-1 $\beta$  ne réduit pas le chimiotactisme des PBMC induit par les neurones. Pourtant, MIP-1 $\beta$  est une chimiokine clé responsable du recrutement des lymphocytes (Schall et coll., 1993 ; Maurer et Von Stebut, 2004). Une explication possible de cette absence d'effet peut être liée au fait que les neurones NT2-N, dans nos conditions, sécrètent environ 70 pg/mL de MIP-1 $\beta$  et qu'une réponse chimiotactique significative des lymphocytes n'a été observée qu'à partir de 100 pg/mL de MIP-1 $\beta$  (Schall et coll., 1993). Toutefois, cette observation n'exclue pas la capacité des neurones à induire le chimiotactisme de lymphocytes *via* la sécrétion de MIP-1 $\beta$  à des temps plus tardifs, lorsque la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les neurones est la plus élevée (Guo et coll., 2003). De plus, la population cellulaire des PBMC que l'on a utilisée est hétérogène. Le tri de populations spécifiques de lymphocytes pourraient nous permettre de démasquer des propriétés chimiotactiques particulières. D'autres facteurs chimioattractants pourraient également être impliqués dans le

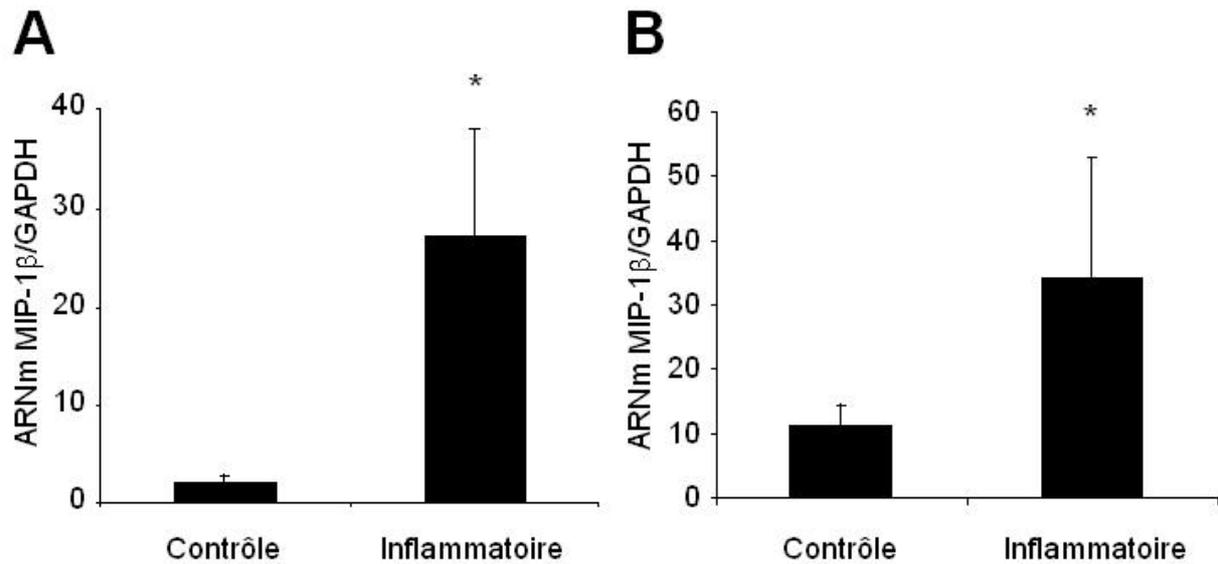
chimiotactisme des PBMC en coculture avec les NT2-N inflammatoires. Par exemple, MCP-1, une chimiokine sécrétée par les NT2-N, est capable d'induire le chimiotactisme des PBMC (Coughlan et coll., 2000 ; Taub et coll., 1995). Des neuromédiateurs, tels que la SP qui est synthétisée par les NT2-N, peuvent également induire le chimiotactisme des PBMC (Li et coll., 2003 ; Schratzberger et coll., 1997b).

En conclusion, cette étude montre que des interactions neuro-épithéliales modulent la sécrétion par les neurones d'autres chimiokines que l'IL-8, en l'occurrence ici MIP-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  pourrait être un médiateur de ces interactions. La recherche de la conséquence fonctionnelle de cette interaction mérite d'être poursuivie afin de préciser le rôle de MIP-1 $\beta$  ou d'autres chimiokines.

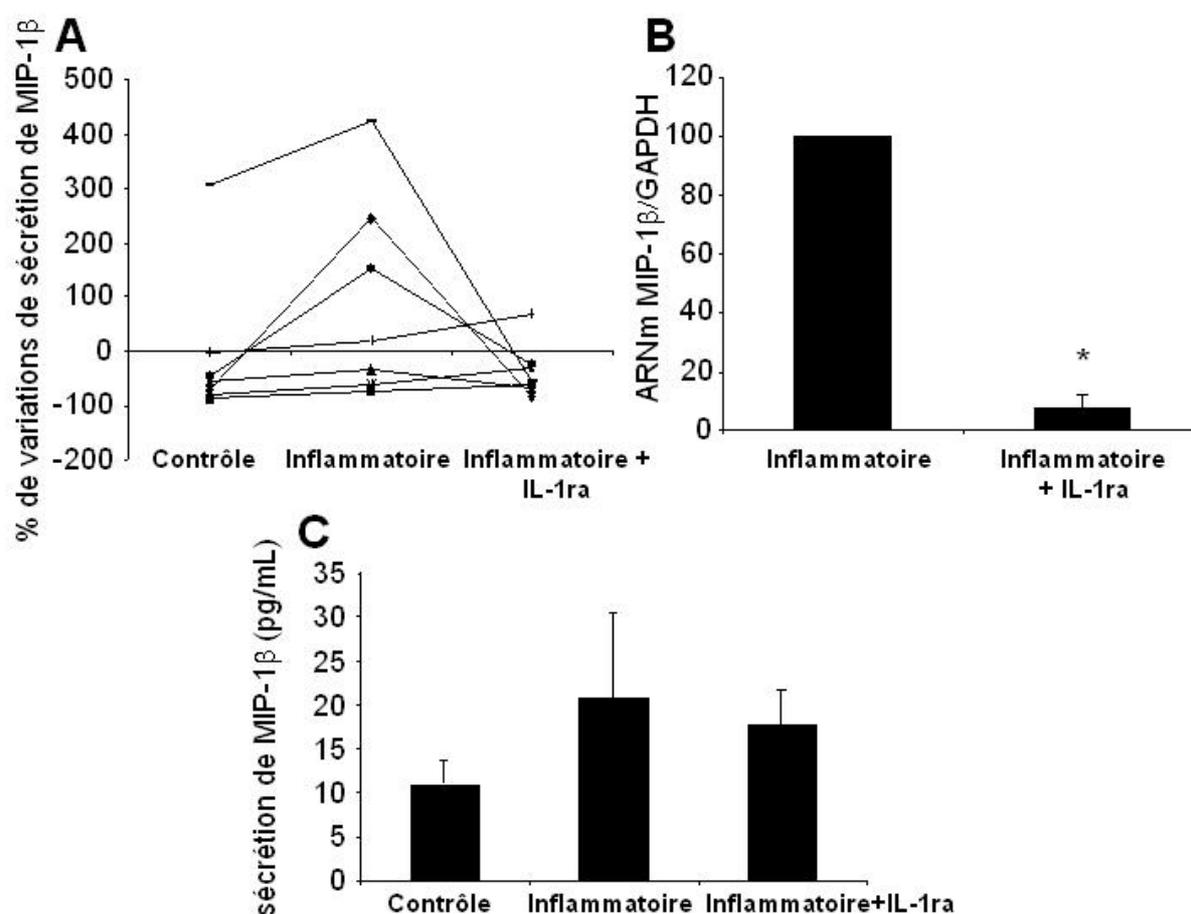
## FIGURES



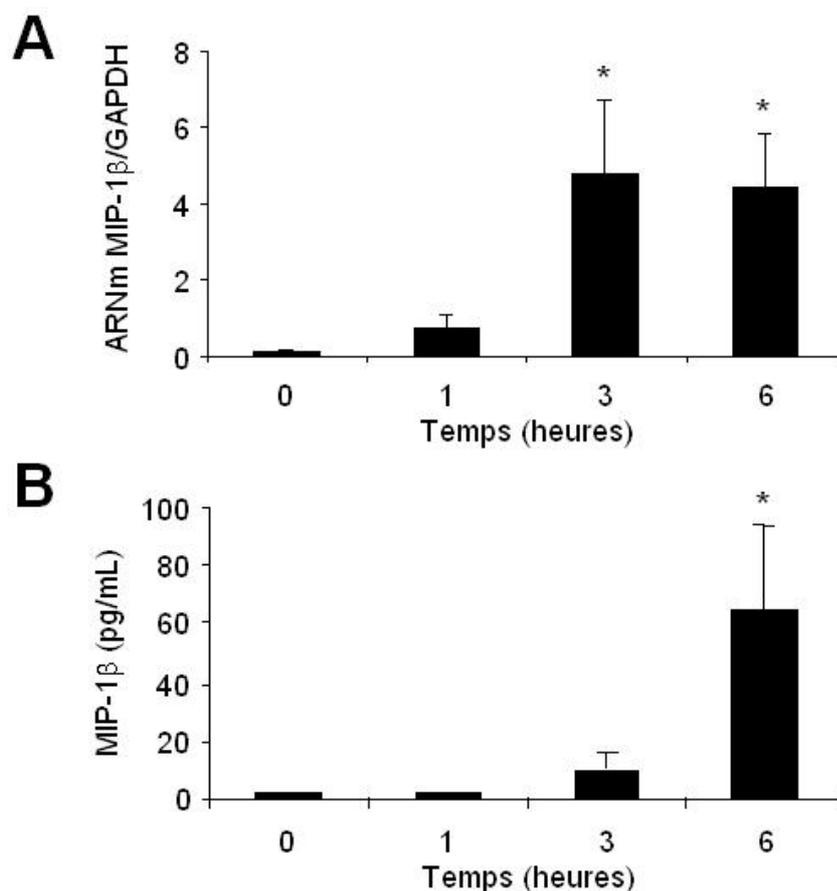
**Figure 29. Des interactions entre les Caco-2 et les NT2-N modulent la sécrétion de MIP-1 $\beta$ .** **A :** Après 24 heures de coculture, la sécrétion de MIP-1 $\beta$  des caco-2 cultivées seules, des NT2-N cultivées seules et de la coculture a été dosée par ELISA. La somme des sécrétions de MIP-1 $\beta$  des Caco-2 et des NT2-N cultivées seules est comparée à la sécrétion de MIP-1 $\beta$  obtenue en coculture. En condition contrôle la sécrétion de MIP-1 $\beta$  en coculture était significativement plus faible que la somme des sécrétions des Caco-2 et des NT2-N cultivées seules (moyenne $\pm$ ES, n=10, test t pairé, \*p<0,05). En revanche, lorsque les caco-2 étaient prétraitées avec un mélange de TNF $\alpha$  ( 10 ng/mL) et d'IFN $\gamma$  (100 u/mL), la sécrétion obtenue en coculture était significativement plus importante que la somme des sécrétions des Caco-2 et des NT2-N cultivées seules (n=10, test t pairé, \*p<0,05). **B :** Le pourcentage de variations de la sécrétion de MIP-1 $\beta$  est significativement plus élevé lorsque les caco-2 ont été prétraitées avec un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  par rapport au contrôle (valeurs individuelles, n=10, test t pairé, \*p<0,05).



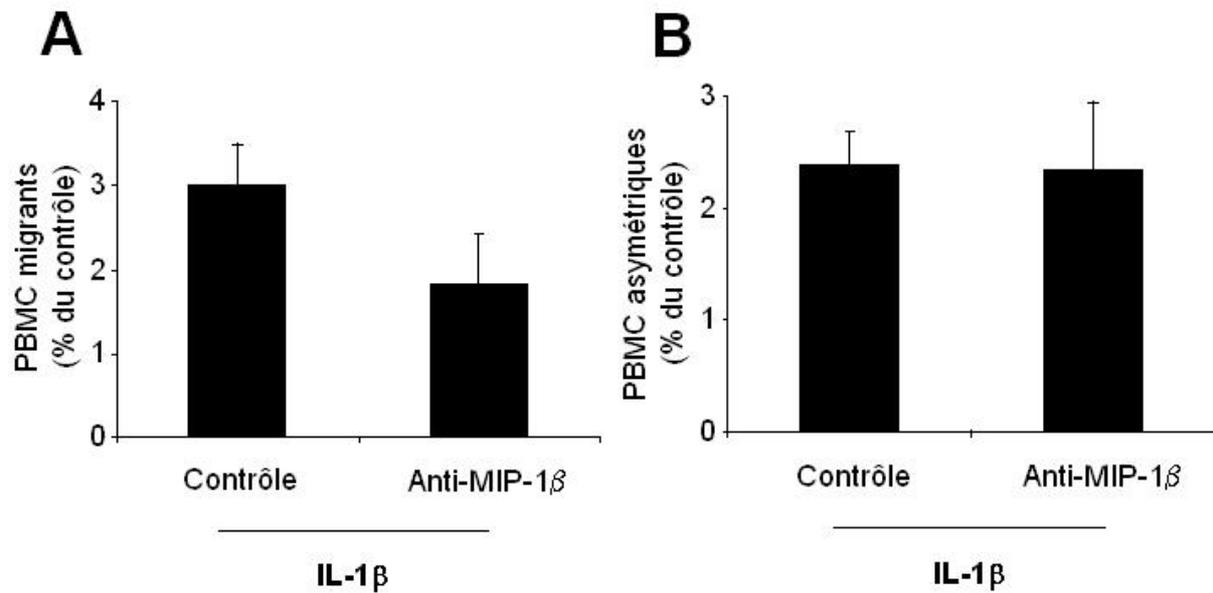
**Figure 30. L'expression des ARNm de MIP-1β est augmentée dans les NT2-N ou les SH-SY5Y en coculture avec les Caco-2 inflammatoires.** Après 24 heures de coculture, l'expression des ARNm de MIP-1β est analysée par PCR en temps réel. **A :** L'expression des ARNm de MIP-1β est plus importante dans les NT2-N cocultivées avec les Caco-2 inflammatoires qu'avec les Caco-2 contrôle (moyenne±ES, n=10, test t pairé, \*p<0,05). **B :** L'expression des ARNm de MIP-1β est plus importante dans les SH-SY5Y cocultivées avec les Caco-2 inflammatoires qu'avec les Caco-2 contrôle (moyenne±ES, n=8, test t pairé, \*p<0,05).



**Figure 31. Rôle de l'IL-1β dans l'augmentation de la sécrétion et de l'expression des ARNm de MIP-1β en coculture en condition inflammatoire.** **A** : La sécrétion de MIP-1β était plus élevée en coculture avec les Caco-2 inflammatoires qu'avec les caco-2 contrôle. Cette augmentation était réduite numériquement mais non significativement par l'IL-1ra (valeurs individuelles, n=7, ANOVA 1 pairée, p=0,282). **B** : L'expression des ARNm de MIP-1β induite dans les NT2-N en coculture avec les Caco-2 inflammatoires était réduite de manière significative par l'IL-1ra. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau d'ARNm de MIP-1β obtenu en coculture en condition inflammatoire (moyenne±ES, n=4, test t pairé, \*p<0,05). **C** : A l'issue de la coculture avec les Caco-2 contrôle ou inflammatoires, les NT2-N étaient cultivées seules 8 heures supplémentaires dans du milieu frais. A la fin de cette période, la sécrétion de MIP-1β était analysée. La sécrétion de MIP-1β par les NT2-N induite par les Caco-2 n'était pas réduite significativement par l'IL-1ra (n=4, moyenne±ES, ANOVA 1 pairée, p=0,820).



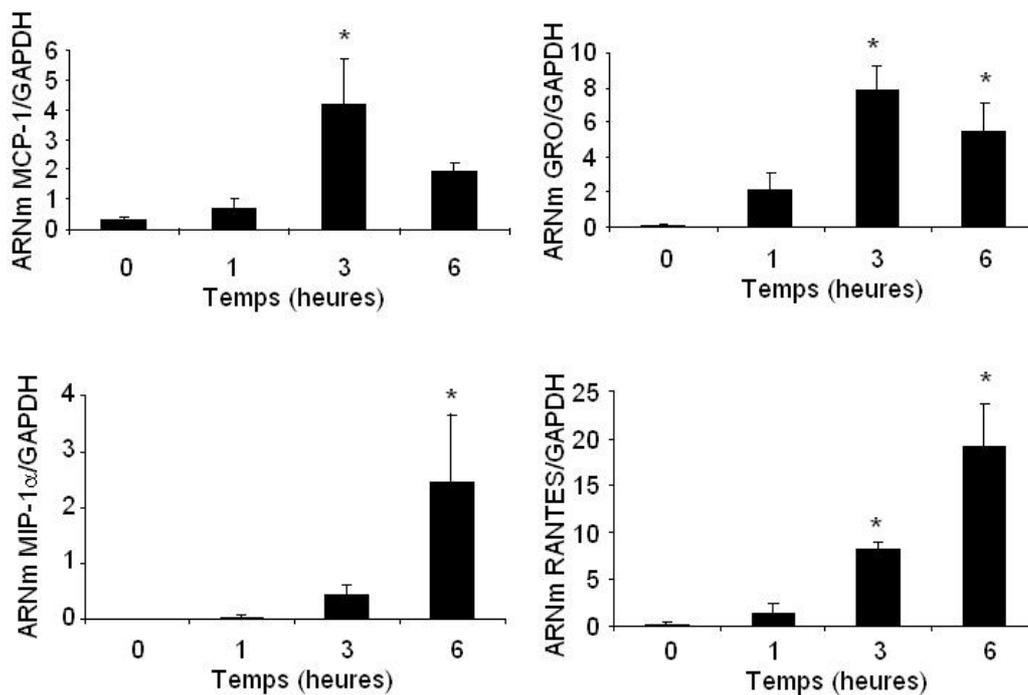
**Figure 32. Cinétique de l'augmentation de l'expression des ARNm et de la sécrétion de MIP-1β par l'IL-1β dans les NT2-N.** **A :** Les NT2-N sont traitées avec de l'IL-1β (10 ng/mL) à différents temps. L'expression des ARNm de MIP-1β est significativement augmentée dès 3 heures par rapport au contrôle (moyenne±ES, n=4, ANOVA 1 pairée, \*p<0,05). **B :** La sécrétion de MIP-1β est significativement augmentée 6 heures après l'ajout de l'IL-1β (moyenne±ES, n=4, ANOVA 1 pairée, \*p<0,05).



**Figure 33. Effet de MIP-1 $\beta$  dans le modèle de chimiotactisme des PBMC induit par les NT2-N en condition inflammatoire.** Les NT2-N étaient cocultivées avec les PBMC en présence ou non d'un anticorps neutralisant anti-MIP-1 $\beta$ . Dans ces conditions, le nombre de PBMC ayant migré vers les neurones et le pourcentage de PBMC asymétriques n'étaient pas réduits ( $n=7$ , moyenne $\pm$ ES, test t pairé,  $p=0,471$  et  $p=0,415$  respectivement). Les résultats sont normalisés par rapport au niveau contrôle du nombre de PBMC ayant migré vers les neurones (**A**, condition contrôle :  $167\pm 37,8$  cells.mm<sup>-2</sup>, contrôle anti-MIP-1 $\beta$  :  $197\pm 39$  cells.mm<sup>-2</sup>) et par rapport au pourcentage de PBMC asymétriques (**B**, condition contrôle :  $29,7\pm 4,1\%$ , contrôle anti-MIP-1 $\beta$  :  $31,6\pm 5,5\%$  and control mIgG:  $39.6\pm 3.6\%$ ) obtenu avec ou sans l'anticorps anti-MIP-1 $\beta$ .

**Régulation de l'expression par l'IL-1 $\beta$  d'autres chimiokines dans les neurones NT2-N**

L'étude du chimiotactisme des PBMC induit par les neurones prétraités à l'IL-1 $\beta$ , a montré l'implication partielle de l'IL-8 dans le pouvoir chimiotactique des neurones. Ces résultats suggèrent donc l'implication potentielle d'autres chimiokines, autres que MIP-1 $\beta$  au regard des résultats précédents. Aussi avons nous recherché l'expression d'autres chimiokines dans les neurones traités à l'IL-1 $\beta$ . Les cellules NT2-N ont été traitées avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) à différents temps. L'expression des chimiokines MCP-1, GRO, MIP-1 $\alpha$  et RANTES a ensuite été analysé par PCR en temps réel. Comme présenté sur la figure 34, l'IL-1 $\beta$  induit de manière significative et en fonction du temps l'expression des ARNm de ces chimiokines.



**Figure 34. L'IL-1 $\beta$  régule l'expression des ARNm de MCP-1, GRO, MIP-1 $\alpha$  et RANTES dans les cellules NT2-N. (n=4, moyenne $\pm$ ES, ANOVA 1 pairée, \*p<0,05 par rapport au contrôle).**

**- DISCUSSION -**

## DISCUSSION GENERALE

### **1- Les deux modèles d'étude des interactions muqueuse/sous-muqueuse colique humaine et des interactions cellules épithéliales intestinales/neurones**

Le premier objectif de ce travail de thèse était de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre le SNE et la barrière épithéliale intestinale dans la régulation d'une chimiokine clé de la réponse inflammatoire intestinale, *i.e.* l'IL-8. Pour ce faire, nous avons développé deux modèles de coculture, dans lesquels les deux composantes du modèle n'établissent pas de contacts directs. Le premier est un modèle organotypique, constitué de muqueuse et de sous-muqueuse coliques humaines, séparées par microdissection à partir de pièces de résection chirurgicale colique. Le second est un modèle cellulaire, composé d'une lignée de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2), cultivées sur filtres Transwell, et de deux lignées neuronales humaines (NT2-N ou SH-SY5Y). Ces modèles de coculture permettent d'analyser la réponse globale des deux composantes, ainsi que leurs réponses individuelles. Ainsi, il est possible de comparer la sécrétion globale de la coculture avec la somme des sécrétions des deux composantes cultivées seules et de déterminer l'existence ou non d'interactions entre les deux composantes. De plus, il est possible dans ces modèles de stimuler ou d'inhiber spécifiquement l'une ou l'autre des composantes avant la coculture, sans craindre l'effet direct de ce traitement sur l'autre composante. Cependant, ces modèles ne sont probablement pas adaptés à l'étude d'interactions entre différents types cellulaires pour lesquelles des contacts directs entre les cellules sont nécessaires.

Le modèle organotypique autorise des études prolongées de plusieurs heures, pendant lesquelles les tissus demeurent dans de bonnes conditions de viabilité (Neunlist et coll., 2003a ; Rouet-Benzineb et coll., 2004). Ce modèle permet également de conserver

l'organisation naturelle du tissu dans chacune des deux couches utilisées. Cependant, la séparation par microdissection de la muqueuse et de la sous-muqueuse entraîne la rupture des contacts entre ces deux couches de tissus (connections nerveuses, lame basale, contacts cellule/cellule). Cette rupture ne semble pourtant pas avoir de conséquences sur l'étude de l'expression d'IL-8 dans les neurones ; en effet, les résultats obtenus après séparation de la muqueuse et de la sous-muqueuse ont été reproduits sur des fragments non disséqués de muqueuse et de sous-muqueuse. Par ailleurs, la muqueuse et la sous-muqueuse maintenues en culture d'organe pendant quelques heures sécrètent un niveau basal d'IL-8 important, bien que ces tissus ne produisent que peu d'IL-8 en situation physiologique. Ainsi, une étude préliminaire a montré que ces tissus n'expriment pas d'ARNm de l'IL-8 avant la mise en culture, alors que leur expression est induite dès 45 minutes de culture d'organe (résultats non publiés). Cette induction de l'expression de l'IL-8 en culture d'organe pourrait être due à une inflammation non spécifique de ces deux couches, du fait de l'ischémie/reperfusion post-opératoire.

Ce modèle étant basé sur l'utilisation de tissus entiers, il ne permet pourtant pas de déterminer l'implication de types cellulaires particulier dans les effets observés. C'est pourquoi nous avons développé le second modèle de coculture qui est un modèle réductionniste d'étude des interactions entre deux types cellulaires : les cellules épithéliales intestinales et les neurones. Nous avons choisi d'étudier les interactions entre ces deux types cellulaires pour trois raisons : (1) des données anatomiques montrent qu'il existe une forte proximité entre les neurones et les cellules épithéliales intestinales, (2) lors d'un stress infectieux intestinal, les cellules épithéliales intestinales sont les premières en contact avec le pathogène et (3) bien que de nombreuses études montrent que les neurones modulent des propriétés des cellules épithéliales (Goyal et Hirano, 1996 ; Neunlist et coll., 2003a), les effets de ces dernières sur des propriétés neuronales n'ont été que peu décrits. Cependant, ce modèle

réductionniste n'a pas les avantages d'un modèle intégré. Il ne reproduit pas, en effet, l'environnement physiologique des cellules. De plus, il faut garder présent à l'esprit que ce modèle utilise des lignées cellulaires tumorales, qui ne reproduisent pas la diversité cellulaire de la barrière épithéliale intestinale et des neurones entériques. Ce modèle pourrait donc être amélioré par l'utilisation de cultures primaires de cellules épithéliales intestinales et de neurones entériques humains.

Afin d'étudier l'effet de l'inflammation sur les interactions entre la barrière épithéliale intestinale et le SNE, la muqueuse a été traitée avec la toxine B du *C. difficile*. Ce modèle inflammatoire a été choisi pour deux raisons principales : (1) le *C. difficile* affecte plusieurs millions de personnes à travers le monde chaque année, et il est à ce titre un pathogène important en terme de santé publique (Riley, 2004) et (2) ses toxines induisent une réponse inflammatoire de l'intestin associée à une augmentation de la sécrétion de cytokines/chimiokines (Pothoulakis et coll., 2001). Dans le modèle cellulaire, les cellules épithéliales intestinales ont été traitées avec un mélange de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  (cytomix). Ce stimulus inflammatoire a été fréquemment utilisé comme modèle inflammatoire sur les cellules épithéliales intestinales (Wang et coll., 2005 ; Kim et coll., 2002). De plus, il s'agit de cytokines majeures sécrétées par les cellules immunitaires au cours de processus infectieux, comme ceux induits par le *C. difficile* (Castagliuolo et coll., 1997; Ishida et coll., 2004).

Par ailleurs, ces modèles de coculture seraient également adaptés à l'étude d'autres agents pathogènes intestinaux, comme *Shigella flexneri* ou *Escherichia coli*. L'effet de probiotiques sur la modulation de l'inflammation intestinale pourrait également être étudié dans de tels modèles.

## **2- Des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine colique, et en particulier entre les cellules épithéliales et les neurones, régulent la sécrétion et l'expression de l'IL-8 dans les neurones**

Cette étude a confirmé expérimentalement l'hypothèse selon laquelle les différentes composantes de l'intestin sont en perpétuelle interaction les unes avec les autres, ce qui détermine la réponse globale du tissu. De plus, des altérations de l'une de ces composantes, du fait de l'inflammation, modifient ces interactions, ce qui a des répercussions sur la réponse globale du tissu.

Nous avons tout d'abord montré que des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse humaine colique diminuent la sécrétion globale d'IL-8 en dehors de toute condition inflammatoire. Des effets similaires ont été observés avec la chimiokine MIP-1 $\beta$  dans le modèle cellulaire. Un médiateur potentiel impliqué dans cette baisse de la sécrétion d'IL-8 et de MIP-1 $\beta$  pourrait être le TGF $\beta$ . Ce facteur est sécrété par des éléments de la muqueuse (Wang et coll., 1995) et est capable de diminuer la sécrétion d'IL-8 et de MIP-1 $\beta$  (Lugering et coll., 1998 ; Claud et coll., 2003 ; Guo et coll., 1998).

Dans un deuxième temps, nous avons montré que des interactions entre la muqueuse et la sous-muqueuse conduisent à une augmentation de la sécrétion globale d'IL-8, en réponse à l'inflammation spécifique de la muqueuse par la toxine B du *C. difficile*. Cette augmentation de la sécrétion d'IL-8 est en accord avec une étude réalisée dans un modèle de xéno greffe d'intestin fœtal humain, montrant que la toxine B du *C. difficile* augmente la sécrétion globale d'IL-8 du tissu (Savidge et coll., 2003). Différents types cellulaires de l'intestin interviennent dans la sécrétion d'IL-8 au cours de l'infection par la toxine B du *C. difficile*. Il s'agit en particulier des cellules épithéliales intestinales et des monocytes (Savidge et coll., 2003 ; Linevsky et coll., 1997). Dans cette étude, nous avons identifié les neurones sous-muqueux

humains comme étant une source supplémentaire d'IL-8 au cours de l'infection par la toxine B du *C. difficile*.

L'utilisation du modèle de coculture cellulaire a confirmé l'implication des cellules épithéliales intestinales et des neurones dans la modulation de la sécrétion d'IL-8 au cours de processus inflammatoires. En effet, des interactions entre les cellules épithéliales intestinales et les neurones augmentent la sécrétion globale d'IL-8, en réponse au prétraitement des Caco-2 avec du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ . De plus, ces interactions conduisent à l'induction de l'expression des ARNm de l'IL-8 dans les neurones, suggérant que l'augmentation de l'immunoréactivité de l'IL-8 dans les neurones sous-muqueux humains est due à une induction de l'expression des ARNm et de la protéine IL-8 dans les neurones. Cette hypothèse mériterait d'être validée par une étude d'hybridation *in situ* sur de la sous-muqueuse humaine. Par ailleurs, des interactions neuro-épithéliales modulent également l'expression d'autres chimiokines dans les neurones. Ainsi, la sécrétion globale de MIP-1 $\beta$  et l'expression des ARNm de cette chimiokine dans les neurones sont augmentées, en réponse à l'inflammation des Caco-2 avec du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ . Le profil neuronal de chimiokines mériterait d'être déterminé au cours de différents mécanismes physiopathologiques intestinaux, afin de préciser le rôle du SNE au cours de la réponse inflammatoire intestinale.

Parallèlement à l'utilisation du stimulus inflammatoire « TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  » dans le modèle cellulaire, nous avons entrepris de traiter les Caco-2 directement avec de la toxine B du *C. difficile* avant la mise en coculture avec les neurones. Nos résultats montrent que l'inflammation des Caco-2 avec différentes doses de toxine B du *C. difficile* ne module pas la sécrétion globale d'IL-8 en coculture. Cette observation suggère que la sécrétion d'IL-8 induite par la toxine B du *C. difficile* dans la muqueuse et la sous-muqueuse pourrait faire intervenir d'autres composantes cellulaires en plus des cellules épithéliales intestinales et des neurones. Ces composantes cellulaires pourraient être les cellules immunitaires (monocytes,

macrophages, ...). Les toxines du *C. difficile* induisent en effet la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IFN $\gamma$  et d'IL-1 $\beta$  par les cellules immunitaires (Linevsky et coll., 1997 ; Ishida et coll., 2004 ; Flegel et coll., 1991), cytokines impliquées dans la modulation de la sécrétion d'IL-8 dans notre modèle de coculture cellulaire.

### **3- L'IL-1 $\beta$ , un régulateur de l'expression et de la sécrétion de l'IL-8**

L'étude des deux modèles de coculture, organotypique et cellulaire, suggère que l'IL-1 $\beta$  joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation. Dans le modèle organotypique, le blocage de l'IL-1 $\beta$ , soit par l'IL-1ra ou soit par un anticorps neutralisant anti-IL-1 $\beta$ , abolit la sécrétion globale d'IL-8 induite par la toxine B du *C. difficile* en coculture organotypique. L'IL-1ra réduit également l'augmentation de l'expression de l'IL-8 dans les neurones sous-muqueux induite par la toxine B du *C. difficile*. Ces résultats suggèrent que l'IL-1 $\beta$  est un médiateur clé des interactions entre la muqueuse et le SNE lors d'un stress infectieux. L'identification dans cette étude du rôle majeur joué par l'IL-1 $\beta$  au cours de l'infection par la toxine B du *C. difficile* est en accord avec des études antérieures. Ainsi, une étude récente menée au laboratoire a démontré que les effets de la toxine B du *C. difficile* sur l'activation des neurones sous-muqueux humains sont médiés par l'IL-1 $\beta$ , dont l'expression des ARNm dans la muqueuse est induite dès 30 minutes après l'ajout de la toxine B (Neunlist et coll., 2003b). Le rôle crucial joué par l'IL-1 $\beta$  lors de processus infectieux a également été montré chez le lapin *in vivo*, modèle dans lequel l'IL-1ra bloque les manifestations inflammatoires induites par *Shigella flexneri* (Sansonetti et coll., 1995).

Dans le modèle de coculture cellulaire, l'IL-1ra réduit également l'augmentation de l'expression des ARNm et de la sécrétion d'IL-8 par les neurones, suggérant que l'IL-1 $\beta$  est également impliquée dans les interactions neuro-épithéliales au cours de l'inflammation. De

plus, des résultats préliminaires suggèrent que l'IL-1 $\beta$  module également l'expression d'autres chimiokines dans les neurones. En particulier, l'IL-1ra réduit l'induction de l'expression des ARNm de MIP-1 $\beta$  dans les neurones en coculture avec les Caco-2 inflammatoires. Cependant, l'IL-1ra ne réduit pas significativement la sécrétion globale d'IL-8 et de MIP-1 $\beta$  induite en coculture en condition inflammatoire. Cette observation suggère l'intervention d'autres médiateurs dans la modulation de la sécrétion de chimiokines dans le modèle de coculture cellulaire en situation inflammatoire. Un médiateur probable pourrait être le TNF $\alpha$ , qui est sécrété par les Caco-2 en réponse à un stress inflammatoire (résultats non publiés). Le TNF $\alpha$  est de plus capable d'induire l'expression d'IL-8 ou de MIP-1 $\beta$  dans les Caco-2 ou les neurones NT2-N (Jijon et coll., 2002 ; Guo et coll., 2003).

#### **4- Les neurones produisent des chimiokines au cours de l'inflammation**

Cette étude est la première mise en évidence de l'expression de l'IL-8 et de sa régulation dans les neurones sous-muqueux humains, au cours d'un stress infectieux inflammatoire. De plus, des résultats préliminaires suggèrent que les neurones produisent également des chimiokines au cours des MICI. Ainsi, nous avons montré sur un patient que les neurones myentériques humains expriment de l'IL-8 au cours de la rectocolite hémorragique. Cette observation mériterait d'être reproduite chez plusieurs autres patients. Chez des patients atteints de pseudo-obstruction colique chronique, une augmentation de l'immunoréactivité de MIP-1 $\alpha$  a de plus été observée dans les neurones myentériques (De Giorgio et coll., 2000c). Par ailleurs, nous avons montré que les cellules gliales entériques humaines expriment également de l'IL-8 en réponse à l'IL-1 $\beta$ . Ce résultat vient compléter une étude antérieure montrant que l'IL-1 $\beta$  stimule la sécrétion d'IL-6 par les cellules gliales entériques de rat (Ruhl et coll., 2001).

L'étude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression des ARNm et de la sécrétion d'IL-8 dans les neurones NT2-N a permis d'identifier les voies MAP kinases p38 et ERK1/2. Des résultats préliminaires suggèrent de plus l'implication d'une voie dépendante de NF- $\kappa$ B. L'identification de ces voies a été réalisée dans une lignée cellulaire neuronale, car aucune méthode n'est pour l'heure disponible pour isoler et maintenir en culture des neurones entériques humains. De plus, la recherche de voies de signalisation est plus aisée dans des modèles cellulaires que dans des tissus entiers. Notre choix s'est porté sur les neurones NT2-N, d'origine humaine, qui expriment une grande variété de marqueurs neuronaux. Ces cellules expriment en particulier des protéines du cytosquelette caractéristiques des neurones, comme des neurofilaments (NF-L, NF-M, NF-66) ou des protéines associées aux microtubules (MAP1A, MAP1B, MAP2 et tau) (Pleasure et coll., 1992). Elles expriment également des neuromédiateurs, comme la substance P ou le VIP, présents dans le SNE (Li et coll., 2003a ; résultats non publiés). L'implication des voies de signalisation p38 et ERK1/2 dans la sécrétion neuronale d'IL-8 pourrait être validée dans les neurones sous-muqueux humains par des techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunohistochimie. Néanmoins, ces résultats sont en accord avec d'autres travaux montrant que l'IL-1 $\beta$  active la voie MAP kinase p38 dans les neurones de l'hippocampe (Srinivasan et coll., 2004) et corticaux (Li et coll., 2003b). Par ailleurs, notre étude n'a pas permis de déterminer si la régulation de l'expression de l'IL-8 est transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Cependant, différentes études ont montré que l'activation de p38 conduit à la stabilisation des ARNm de l'IL-8, grâce à des éléments de l'ARNm riches en AU (Holtmann et coll., 1999 ; Winzen et coll., 1999). Les voies MAP kinases p38 et ERK1/2, et NF- $\kappa$ B ont également été impliquées dans la régulation de l'expression de l'IL-8 par des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$  dans les cellules épithéliales intestinales (Jijon et coll., 2002 ; Parhar et coll., 2003 ; Garat et coll., 2003). Ce n'est donc pas

étonnant d'observer que les inhibiteurs des voies p38 et ERK1/2 réduisent la sécrétion globale d'IL-8 induite par des conditions inflammatoires dans le modèle de coculture cellules épithéliales intestinales/neurones.

Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent que l'IL-1 $\beta$  régule également l'expression d'autres chimiokines dans les neurones. Ainsi, nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression des ARNm de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, RANTES et GRO dans les neurones NT2-N. Ces résultats mériteraient d'être validés dans les neurones entériques humains.

#### **5- Les neurones, en conditions inflammatoires, sont capables d'induire le chimiotactisme de cellules immunitaires par la sécrétion d'IL-8**

Un des objectifs de ce travail de thèse était de déterminer un rôle fonctionnel potentiel de la sécrétion de chimiokines par les neurones entériques. Il s'agissait en particulier de déterminer la capacité des neurones à induire le chimiotactisme de cellules immunitaires. Pour ce faire nous avons développé un modèle de coculture, composé de PBMC et de neurones NT2-N. Les PBMC étaient cultivés sur des filtres Transwell, dont le diamètre des pores permet leur passage. Les neurones NT2-N étaient placés sous ce filtre. Ce modèle est inspiré du modèle de la chambre de Boyden, qui a fréquemment été repris pour étudier le rôle chimiotactique de différentes molécules ou de cellules. Cependant, ces études utilisaient en général du surnageant de culture et non les cellules elles-mêmes, négligeant ainsi l'effet d'interactions entre le type cellulaire étudié et les cellules immunitaires. Dans notre étude, nous avons évalué le chimiotactisme des PBMC à l'aide de deux paramètres : un couramment utilisé, à savoir le nombre de cellules ayant migré vers les neurones, et un autre plus original, qui est le pourcentage de cellules morphologiquement asymétriques. Ce dernier permet

d'identifier les modifications du cytosquelette des cellules immunitaires, qui est un processus majeur du chimiotactisme des cellules (Wilkinson, 1998).

L'utilisation de ce modèle a montré qu'en l'absence de stimulus inflammatoire les neurones n'induisent pas le chimiotactisme des PBMC. Cette observation est en accord avec une étude récente montrant que, en situation contrôle, les neurones NT2-N ne produisent pas de chimiokines et qu'ils ne possèdent pas de propriétés chimiotactiques (Lu et coll., 2005). En revanche, après activation des neurones NT2-N par l'IL-1 $\beta$ , les neurones induisent le chimiotactisme des PBMC. Ce résultat est, à notre connaissance, la première mise en évidence *in vitro* du pouvoir chimiotactique des neurones sur les cellules immunitaires en conditions inflammatoires. Cette propriété des neurones démontrée *in vitro* est en accord avec des études menées *in vivo*. La faculté des neurones à induire la migration de cellules immunitaires avait en effet déjà été suggérée dans le système nerveux central *in vivo*. Ainsi, l'infection par le virus de la rougeole induit l'expression de IP-10 et de RANTES par les neurones et la formation d'infiltrats inflammatoires composés de lymphocytes T dans le cerveau. La formation de cet infiltrat peut être empêchée par des anticorps neutralisants dirigés contre ces chimiokines (Patterson et coll., 2003). Dans l'intestin, la capacité du SNE à induire le chimiotactisme des cellules immunitaires avait également été suggérée par l'observation de la présence d'infiltrats inflammatoires au sein de ganglions des plexus myentérique et sous-muqueux (De Giorgio et coll., 2004b). Ces infiltrats sont principalement composés de lymphocytes CD4 ou CD8 positifs, d'éosinophiles et de neutrophiles chez l'homme ou dans des modèles animaux inflammatoires ou infectieux (De Giorgio et coll., 2004b ; Sanovic et coll., 1999 ; Bogers et coll., 2000). En particulier, Linden et coll. (2005) ont montré que les infiltrats inflammatoires formés dans les ganglions après un traitement des animaux au TNBS sont d'abord composés de neutrophiles puis de lymphocytes. Ces résultats

suggèrent l'intervention séquentielle de différents facteurs chimioattractants au sein des ganglions entériques.

Dans notre étude, nous avons identifié l'IL-8 comme étant un médiateur du chimiotactisme des PBMC induit par les neurones en conditions inflammatoires. Ce résultat est en accord avec une étude récente montrant que l'infiltration de neutrophiles induite dans le cerveau par l'ischémie cérébrale est bloquée par un inhibiteur des récepteurs de l'IL-8 *in vivo* (Garau et coll., 2005). Cet inhibiteur réduit de plus la mort neuronale induite par l'infiltration de neutrophiles. Dans le SNE, le rôle majeur joué par l'IL-8 dans la génération d'infiltrats inflammatoires au sein des ganglions a également été récemment suggéré. Ainsi, dans le modèle inflammatoire TNBS, les neutrophiles envahissent les ganglions entériques dès les phases précoces de l'inflammation (Linden et coll., 2005). L'IL-8 serait donc exprimée au cours de la phase aiguë de l'inflammation. De plus, l'apoptose des neurones induite par le TNBS est réduite après l'administration d'un sérum anti-neutrophiles, suggérant le rôle de l'IL-8 au cours des phénomènes de neurodégénérescence entérique (Boyer et coll., 2005). Cependant, l'anticorps neutralisant anti-IL-8 n'a pas permis de bloquer toute la réponse chimiotactique des PBMC induite par les neurones inflammatoires, suggérant l'implication d'autres facteurs dans notre modèle. En effet, les neurones NT2-N expriment et sécrètent différentes chimiokines telles que MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (Coughlan et coll., 2000 ; Guo et coll., 2003), qui sont capables d'induire le chimiotactisme des PBMC (Taub et coll., 1995 ; Schall et coll., 1993). Cependant, notre étude n'a pas permis de confirmer que les neurones NT2-N en conditions inflammatoires induisent le chimiotactisme des PBMC par la sécrétion de MIP-1 $\beta$ . Cependant, cette observation n'exclue pas la capacité des neurones à induire le chimiotactisme de lymphocytes *via* MIP-1 $\beta$  à des temps plus tardifs, pour lesquelles la sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les neurones est plus importante (Guo et coll., 2003). Ce résultat conforterait de plus l'hypothèse selon laquelle des chimiokines interviennent séquentiellement

pour attirer différentes populations de cellules immunitaires. Par ailleurs, d'autres chimiokines, telles que RANTES et GRO, dont nous avons montré que l'IL-1 $\beta$  induit leur expression dans les NT2-N, peuvent également être impliquées dans le chimiotactisme des PBMC induit par les NT2-N en conditions inflammatoires. RANTES, en particulier, est capable d'induire le chimiotactisme des PBMC (Taub et coll., 1995). D'autres facteurs chimiotactiques potentiels peuvent être des neuromédiateurs, tels que la SP et le VIP, dont l'expression a été détectée dans les neurones NT2-N (Li et coll., 2003 ; résultats non publiés), et qui sont capables d'induire *in vitro* le chimiotactisme des PBMC (Schratzberger et al., 1997b ; Johnston et coll., 1994).

Au delà du rôle chimiotactique que jouent les chimiokines, elles peuvent également intervenir dans des processus de réparation, comme le suggèrent des travaux récents (Wilson et coll., 1999 ; Brew et coll., 2000). Ainsi, l'IL-8 sécrétée par les neurones sous-muqueux pourrait participer aux phénomènes de réparation de la barrière épithéliale intestinale, comme le suggèrent les travaux de Wilson et coll. (1999) concernant les effets de l'IL-8 sur la migration de la lignée colique humaine LIM1215. L'IL-8 sécrétée par les neurones entériques pourrait de plus cibler les neurones eux-mêmes par un mécanisme autocrine ou paracrine, par analogie avec les mécanismes décrits dans le système nerveux central. Des études ont en effet montré que des neurones centraux expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2, impliqués dans les processus de neuroprotection induits par les chimiokines (Cartier et coll., 2005). Ainsi, des chimiokines du groupe CXC (IL-8, GRO $\alpha$  et GRO $\beta$ ) se fixent sur ces récepteurs et sont capables de moduler des propriétés neuronales. La stimulation de neurones du cervelet par les chimiokines IL-8, GRO $\alpha$  ou GRO $\beta$  module en effet les transmissions synaptiques et la plasticité synaptique par l'activation de ERK1/2, conduisant à des modifications de la libération de neurotransmetteurs (Giovannelli et coll., 1998 ; Ragozzino et coll., 1998). De plus, GRO $\beta$  diminue l'apoptose des neurones du cervelet de rat induite par une chute de la

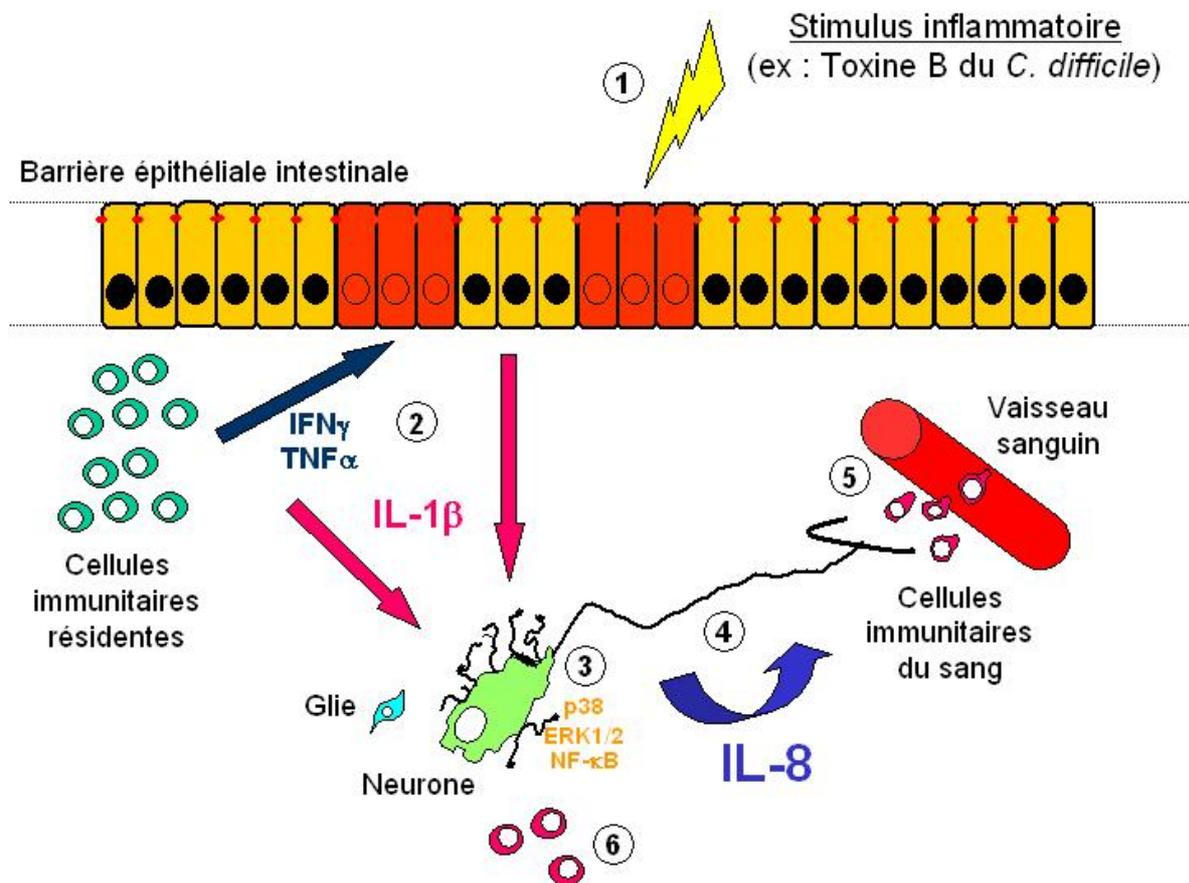
concentration de potassium de 25 mM à 5 mM (Limatola et coll., 2000). Enfin, des chimiokines CXC joueraient également le rôle de facteurs neurotrophiques. Ainsi, une étude a montré que Mig (Monokine induite par l'IFN $\gamma$ ), une autre chimiokine du groupe CXC, augmente l'extension des neurites des cellules neuronales PC12 par l'activation de ERK1/2 et la survie de ces neurones *via* la PI<sub>3</sub> Kinase, et aurait ainsi les mêmes effets que le NGF (Uwabe et coll., 2005).

**- CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES -**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a démontré la capacité des neurones entériques à produire de l'IL-8, une chimiokine clé de l'inflammation intestinale. Lors de processus inflammatoires, l'expression de l'IL-8 est de plus modulée par des interactions entre le SNE et la barrière épithéliale intestinale. Cette étude a également identifié l'IL-1 $\beta$  comme un médiateur clé de ces interactions ; celle-ci régule l'expression neuronale d'IL-8 par les voies MAP kinases p38 et ERK1/2. Enfin, les neurones sont capables d'induire le chimiotactisme de cellules immunitaires, *via* la production d'IL-8. Les différents résultats de ce travail nous ont permis de dresser un modèle hypothétique des interactions cellulaires conduisant à la production de chimiokines par les neurones, et au recrutement de cellules immunitaires au voisinage des neurones (Figure 35).

La capacité des neurones entériques à produire des chimiokines pourrait jouer un rôle important dans le déroulement de la réponse inflammatoire intestinale, au même titre que les autres composantes du tube digestif impliquées dans la production de chimiokines (cellules immunitaires, épithéliales, musculaires, ...). Les neurones entériques innervent en effet différentes composantes du tube digestif, telles que les cellules épithéliales intestinales et les vaisseaux sanguins. Ainsi, la sécrétion de chimiokines par les neurones au voisinage des vaisseaux sanguins pourrait participer au recrutement précis des cellules immunitaires au cours de processus inflammatoires. Par ailleurs, les neurones entériques sont en contact permanent avec les cellules gliales entériques (CGEs), qui assurent l'homéostasie des neurones. Les CGEs pourraient alors jouer un rôle important dans le contrôle de la production de chimiokines par les neurones. De plus, les CGEs sont elles-mêmes capables de produire des chimiokines. Le rôle des CGEs dans la sécrétion de chimiokines au cours de la réponse inflammatoire intestinale reste donc à déterminer.



**Figure 35. Modèle hypothétique des interactions cellulaires conduisant à la production d'IL-8 par les neurones, et au recrutement de cellules immunitaires au voisinage des neurones. (1) agression de la barrière épithéliale intestinale par un agent pathogène et stimulation du système immunitaire, (2) sécrétion de médiateurs inflammatoires par les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires, (3) activation des voies p38 et ERK1/2 dans les neurones, (4) production neuronale d'IL-8, (5) recrutement de cellules immunitaires à partir du sang et (6) formation d'un infiltrat inflammatoire au sein des ganglions.**

La capacité des neurones entériques à recruter des cellules immunitaires peut être responsable de la génération d'infiltrats inflammatoires au sein des ganglions entériques, pouvant conduire à des phénomènes de neurodégénérescence. Dans ce cadre, la production neuronale de chimiokines constituerait une cible thérapeutique intéressante. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des chimiokines pourrait limiter la mort neuronale induite au cours de processus inflammatoires, en bloquant l'infiltration de cellules immunitaires. Cependant, l'utilisation de tels inhibiteurs pourrait également bloquer les effets neuroprotecteurs et neurotrophiques des chimiokines.

Enfin, ce travail ouvre également des perspectives d'étude des pathologies inflammatoires du système nerveux central (Alzheimer, Parkinson, ...), dans lesquelles les chimiokines sont impliquées. En effet, chez l'homme, le tube digestif est un organe plus accessible que le cerveau pour réaliser des expériences. De ce fait, l'utilisation de modèles de neurones entériques humains pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques inflammatoires centraux chez l'homme. De plus, ces modèles entériques humains pourraient permettre de tester des traitements éventuels contre des pathologies inflammatoires du système nerveux central.

**- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### -A-

Abad C, Juarranz Y, Martinez C, Arranz A, Rosignoli F, Garcia-Gomez M, Leceta J, Gomariz RP. (2005) cDNA Array Analysis of Cytokines, Chemokines, and Receptors Involved in the Development of TNBS-induced Colitis: Homeostatic Role of VIP. *Inflamm Bowel Dis* 11:674-684.

Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, and Gomariz RP. (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 961-971.

Agro A, Stanisz AM. (1993) Inhibition of murine intestinal inflammation by anti-substance P antibody. *Reg Immunol* 5:120-6.

Akiho H, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM. (2002) Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G226-32.

Andriantsitohaina R, Surprenant A. (1992) Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. *J Physiol* 453:493-502.

Anglade P, Michel C, Roze C. (1987) Intrinsic nerves of the pancreas after celiac and superior mesenteric ganglionectomy in rats: a morphologic study of acetylcholinesterase activity and catecholamine histofluorescence. *Pancreas* 2:568-77.

Arai F, Takahashi T, Furukawa K, Matsushima K, Asakura H. (1998a) Mucosal expression of interleukin-6 and interleukin-8 messenger RNA in ulcerative colitis and in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 43:2071-9.

Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Okayasu I. (1998b) Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* 10:890-6.

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. (2004) NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 5:417-25.

Aube AC, Cherbut C, Roze C, Galmiche JP. (2001) Vasoactive intestinal peptide is involved in the inhibitory effect of interleukin-1 beta on the jejunal contractile response induced by acetylcholine. *Gastroenterol Clin Biol* 25:1090-5.

Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y et Kono T. (2004) The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends in Microbiology* 12:394-398.

### -B-

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84:1045-9.

Baggiolini M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-8.

Balemba OB, Semuguruka WD, Hay-Schmidt A, Johansen MV, Dantzer V. (2001) Vasoactive intestinal peptide and substance P-like immunoreactivities in the enteric nervous system of the pig correlate with the severity of pathological changes induced by *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 31:1503-14.

Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. (2003) Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 199:28-35.

- Bar KJ, Facer P, Williams NS, Tam PK, Anand P. (1997) Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 112:1381-5.
- Baumgart DC et Dignass AU. (2002) Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:685-694.
- Bayliss WM et Starling EH. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol (London)* 24:99-143.
- Bayliss WM et Starling EH. (1900a) The movements and innervation of the large intestine. *J Physiol (London)* 26:107-118.
- Bayliss WM et Starling EH. (1900b) The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol (London)* 26:125-138.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79:1277-85.
- Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. (1997) Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40:767-74.
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD et Hecht G. (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52:439-451.
- Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. (2003) Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 52:840-6.
- Bertrand PP, Bornstein JC. (2002) ATP as a putative sensory mediator: activation of intrinsic sensory neurons of the myenteric plexus via P2X receptors. *J Neurosci* 22:4767-75.
- Bishop AE, Polak JM, Bryant MG, Bloom SR, Hamilton S. (1980) Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease. *Gastroenterology* 79:853-60.
- Bjerknes M et Cheng H. (2001) Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci* 98:12497-502.
- Blais A, Aymard P, Lacour B. (1997) Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflugers Arch* 434:300-5.
- Blum AM, Metwali A, Cook G, Mathew RC, Elliott D, Weinstock JV. (1993) Substance P modulates antigen-induced, IFN-gamma production in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol* 151:225-33.
- Blum AM, Metwali A, Kim-Miller M, Li J, Qadir K, Elliott DE, Lu B, Fabry Z, Gerard N, Weinstock JV. (1999) The substance P receptor is necessary for a normal granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol* 162:6080-5.
- Böcker U, Schottelius A, Watson JM, Holt L, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB, Jobin C. (2000) Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 275:12207-13.
- Bogers J, Moreels T, De Man J, Vrolix G, Jacobs W, Pelckmans P, van Marck E. (2000) *Schistosoma mansoni* infection causing diffuse enteric inflammation and damage of the enteric nervous system in the mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 12:431-40.
- Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. (2003) Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130:6387-400.

- Booth C, Potten CS. (2000) Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105:1493-9.
- Boquet P et Lemichez E. (2003) Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends in Cell Biology* 13:238-246.
- Bornstein JC, Costa M, Grider JR. (2004) Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:34-8.
- Bouma G, Strober W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3:521-33.
- Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K. (2005) Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosci* 117:41-53.
- Bradley JS Jr, Parr EJ, Sharkey KA. (1997) Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 289:455-61.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. (1992) Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339:89-91.
- Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Laboisse CL. (1997) Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* 112:1887-94.
- Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. (1996) Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 28:29-38.
- Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 12:78-85.
- Brito GAC, Fujji J, Carneiro BA, Lima AAM, Obrig T, Guerrant RL. (2002) Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. *J Infect Dis* 186:1438-1447.
- Brookes SJ, Meedeniya AC, Jobling P, Costa M. (1997) Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J Physiol* 505:473-91.
- Burgess AW. (1998) Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:903-9.
- Burns AJ, Pasricha PJ, Young HM. (2004) Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:3-7.
- Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93:189-201.
- C-**
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93.
- Camilleri M. (2002) Advances in diabetic gastroparesis. *Rev Gastroenterol Disord* 2:47-56.
- Carbohydrate Antigens I, X, and Y. *Infection and Immunity* 59:73-78.
- Cario E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: toll like receptors and NOD2. *Gut* 54:1182-1193.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 48:16-42.

- Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. (1995) Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 154:2434-40.
- Castagliuolo I, Keates AC, Qiu BS, Kelly CP, Nikulasson ST, Leeman SE, and Pothoulakis C. (1997) Increased substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4788-4793.
- Castagliuolo I, Keates AC, Wang CC, Pasha A, Valenick L, Kelly CP, Nikulasson ST, LaMont JT, and Pothoulakis C. (1998a) *Clostridium difficile* toxin A stimulates macrophage inflammatory protein-2 production in rat intestinal epithelial cells. *J Immunol* 160: 6039-6045.
- Castagliuolo I, LaMont JT, Letourneau R, Kelly CP, O'Keane JC, Jaffer A, Theoharides TC, et Pothoulakis C. (1994) Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Gastroenterology* 107: 657-665, 1994.
- Castagliuolo I, Riegler M, Nikulasson S, Lu B, Gerard C, Gerard NP, and Pothoulakis C (1998b). NK-1 receptor is required in *Clostridium difficile*-induced enteritis. *J Clin Invest* 101: 1547-1550.
- Castell T, Gomez de Segura IA, Vazquez I, Mata A, De Miguel E. (2001) Somatostatin blockade improves the proliferative response but not intestinal morphological growth after small bowel resection in rats. *Eur J Surg* 167:54-9.
- Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF. (2003) CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet* 67:35-41.
- Chowers Y, Cahalon L, Lahav M, Schor H, Tal R, Bar-Meir S, Levite M. (2000) Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF-alpha- and bacteria-induced IL-8 and IL-1 beta secretion from intestinal epithelial cells. *J Immunol* 165:2955-61.
- Clark SB, Rice TW, Tubbs RR, Richter JE, Goldblum JR. (2000) The nature of the myenteric infiltrate in achalasia: an immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 24:1153-8.
- Claud EC, Savidge T, Walker WA. (2003) Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res* 53:419-25.
- Collins SM. (1996) The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111:1683-99.
- Cominelli F, Nast CC, Duchini A, Lee M. (1992) Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. *Gastroenterology* 103:65-71.
- Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP, Elson CO. (1998) CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 187:855-64.
- Cook RD, Burnstock G. (1976) The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J Neurocytol* 5:195-206.
- Cooke HJ, Sidhu M, Fox P, Wang YZ, Zimmermann EM. (1997) Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am J Physiol* 272:G238-45.
- Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ. (1997) 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil* 9:181-6.
- Cooke HJ. (1992) Neuro-modulation of ion secretion by inflammatory mediators. *Ann N Y Acad Sci* 664:346-52.
- Cooke HJ, Wang YZ, Rogers R. (1993) Coordination of Cl- secretion and contraction by a histamine H2-receptor agonist in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 265:G973-8.

- Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. (2000) Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* 47:589-94.
- Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. (2001) Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13306-11.
- Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. (1996) Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75:949-67.
- Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H, Kalyuzhny A, Lee VM, Wolf B, Doms RW, Kolson DL. (2000) Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 97:591-600.
- Cross AK, Richardson V, Ali SA, Palmer I, Taub DD, Rees RC. (1997) Migration responses of human monocytic cell lines to alpha- and beta-chemokines. *Cytokine* 9:521-8.
- Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, Lu T, Nikolaus S, Yang SK, Krawczak M, Kim WH, Schreiber S. (2003) Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 11:6-16.
- Crowe SE, Soda K, Stanisz AM, Perdue MH. (1993) Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am J Physiol* 264:G617-23.
- Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H. (2002) Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int* 40:301-6.
- D-**
- Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. (1996) Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 38:216-22.
- Danese S, Sans M, Fiocchi C. (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews* 3:394-400.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115:1405-13.
- De Baey A, Mende I, Baretton G, Greiner A, Hartl WH, Baeuerle PA, Diepolder HM. (2003) A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J Immunol* 170:5089-94.
- De Giorgio R, Barbara G, Pulsatelli L, Stanghellini V, Dolzani P, Meliconi R, Mazzotta E, Benedikter M, Corradi F, Facchini A, Collins SM, Corinaldesi R. (2000c) Chemokine expression and lymphocyte subsets in patients with idiopathic myenteric ganglionitis (abstr). *Gastroenterology* 118:A630.
- De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, Cogliandro RF, Arrigoni A, Santini D, Ceccarelli C, Salvioli B, Rossini FP, Corinaldesi R. (2000) Idiopathic myenteric ganglionitis underlying intractable vomiting in a young adult. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:613-6.
- De Giorgio R, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Salvioli B, Tonini M, Velio P, Bassotti G, Corinaldesi R. (2002) Clinical and morphofunctional features of idiopathic myenteric ganglionitis underlying severe intestinal motor dysfunction: a study of three cases. *Am J Gastroenterol* 97:2454-9.

De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. (2003) Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. *Gastroenterology* 125:70-79.

De Giorgio R, Camilleri M. (2004a) Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterol Motil* 16:515-31.

De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA, Mawe GM. (2004b) Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 126:1872-83.

De Giorgio R, Stanghellini V, Barbara G, Corinaldesi R, De Ponti F, Tonini M, Bassotti G, Sternini C. (2000) Primary enteric neuropathies underlying gastrointestinal motor dysfunction. *Scand J Gastroenterol* 35:114-122.

Dekkers JA, Akkermans LM, Kroese AB. (1997) Effects of the inflammatory mediator prostaglandin E2 on myenteric neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 272:G1451-6.

Delgado M, Ganea D. (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol* 167:966-75.

Delgado M, Ganea D. (2003) Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-8 production in human monocytes by downregulating nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 302:275-83.

Delgado M, Pozo D, Martinez C, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, Gomariz RP. (1999) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 162:2358-67.

Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP, et Neutra MR. (2002) How the gut senses its content. *Cellular Microbiology* 4(2), 61-72.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114:385-91.

Dignass AU, Becker A, Spiegler S, Goebell H. (1998) Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur J Clin Invest* 28:554-61.

Domek MJ, Blackman EI, Kao J, Zhang XY, Iwata F, Seno K, Leung FW. (1997) Functional ablation of afferent nerves aggravates dextran sulphate sodium-induced colonic damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 12:698-702.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102:448-55.

## **-E-**

Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. (1993) Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105:1689-97.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-67.

## **-F-**

Feher E, Kovacs A, Gallatz K, Feher J. (1997) Direct morphological evidence of neuroimmunomodulation in colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 4:250-7.

- Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, Eisenberg SP, Nast CC, Cominelli F. (1994) Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 94:449-53.
- Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM. (1982) Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297:409-10.
- Fiocchi C. (1997) Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 273:G769-75
- Fiocchi C. (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.
- F Fiorentini C, Fabbri A, Falzano L, Fattorossi A, Matarrese P, Rivabene R, Donelli G. (1998) *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun* 66:2660-2665.
- Flegel WA, Muller F, Daubener W, Fischer HG, Hadding U, Northoff H. (1991) Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. *Infect Immun* 59:3659-66.
- Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. (2004) Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53:987-92.
- Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra MR. (1996) Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 184:1045-59.
- Frieling T, Palmer JM, Cooke HJ, Wood JD. (1994) Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 107:1602-9.
- Frieling T, Rupprecht C, Kroese AB, Schemann M. (1994) Effects of the inflammatory mediator prostaglandin D2 on submucosal neurons and secretion in guinea pig colon. *Am J Physiol* 266:G132-9.
- Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T, Fujimiya M, Mantyh C, Voss M, Eubanks S, Harris M, Pappas TN, Takahashi T. (2003) Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1269-76.
- Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC. (1995) Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 7:89-96.
- Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC. (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54:1-18.
- Furness JB, Kunze WA, Clerc N. (1999) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol* 277:G922-8.
- Furness JB. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81, 87-96.
- Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, MacDermott RP, Sanderson IR. (1998) Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1beta and lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 43:84-90.
- G-**
- Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM. (2000) Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G259-65.
- Galligan JJ, Jiang MM, Shen KZ, Surprenant A. (1990) Substance P mediates neurogenic vasodilatation in extrinsically denervated guinea-pig submucosal arterioles. *J Physiol* 420:267-80.

- Garat C, Arend WP. (2003) Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Cytokine* 23:31-40.
- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P. (2005) Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 30:125-31.
- Gazouli M, Zacharatos P, Gorgoulis V, Mantzaris G, Papalambros E, Ikononopoulos J. (2004) The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in Greek population. *Gastroenterology* 126:367-9.
- Geboes K, Collins S. (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10:189-202.
- Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, Mebis J, Penninckx F, Vantrappen G, Desmet VJ. (1992) Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103:439-47.
- Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343:766-7.
- Gerhard R, Schmidt G, Hofmann F, Aktories K. (1998) Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells. *Infect Immun* 66:5125-5131.
- Gershon MD. (1998) V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am J Physiol* 275:G869-73.
- Gershon MD. (2003) Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 3:600-607.
- Gillitzer R, Goebeler M. (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513-21.
- Gionchetti P, Campieri M, Belluzzi A, Bertinelli E, Ferretti M, Brignola C, Poggioli G, Miglioli M, Barbara L. (1994) Mucosal concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in pelvic ileal pouches. *Dig Dis Sci* 39:1525-31.
- Giovannelli A, Limatola C, Ragozzino D, Mileo AM, Ruggieri A, Ciotti MT, Mercanti D, Santoni A, Eusebi F. (1998) CXC chemokines interleukin-8 (IL-8) and growth-related gene product alpha (GROalpha) modulate Purkinje neuron activity in mouse cerebellum. *J Neuroimmunol* 92:122-32.
- Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. (2003) Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 24:652-8.
- Goldblum JR, Rice TW, Richter JE. (1996) Histopathologic features in esophagomyotomy specimens from patients with achalasia. *Gastroenterology* 111:648-654.
- Goldblum JR, Whyte RI, Orringer MB, Appelman HD. (1994) Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens. *Am J Surg Pathol* 18:327-337.
- Goldhill JM, Sanders KM, Sjogren R, Shea-Donohue T. (1995) Changes in enteric neural regulation of smooth muscle in a rabbit model of small intestinal inflammation. *Am J Physiol* 268:G823-30.
- Goyal RK, Hirano I. (1996) The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334:1106-15.
- Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. (1996) Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 38:90-8.
- Guo CJ, Douglas SD, Lai JP, Pleasure DE, Li Y, Williams M, Bannerman P, Song L, Ho WZ. (2003) Interleukin-1beta stimulates macrophage inflammatory protein-1alpha and -1beta expression in human neuronal

cells (NT2-N). *J Neurochem* 84:997-1005.

Guo H, Jin YX, Ishikawa M, Huang YM, van der Meide PH, Link H, Xiao BG. (1998) Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by lipopolysaccharide, proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *Scand J Immunol* 48:502-8.

Gwee KA, Collins SM, Read NW, Rajnakova A, Deng Y, Graham JC, McKendrick MW, Moolhala SM. (2003) Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 52:523-6.

## **-H-**

Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.

Hallgren A, Flemstrom G, Nylander O. (1998) Interaction between neurokinin A, VIP, prostanooids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* 275:G95-103.

Hammond GA, Johnson JL. (1995) The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb Pathog* 19:203-13.

Hanani M, Reichenbach A. (1994) Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 278:153-60.

Hansen MB (2003) The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacol Toxicol* 92:105-113.

Hassani H, Lucas G, Rozell B, Ernfors P. (2005) Attenuation of acute experimental colitis by preventing NPY Y1 receptor signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G550-6.

Hayden UL, Carey HV. (2000) Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1589-94.

He D, Sougioultzis S, Hagen S, Liu J, Keates S, Keates AC, Pothoulakis C, LaMont JM. (2002) *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* 122:1048-1057.

Hecht G, Koutsouris A, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. (1992) *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* 102:416-423.

Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. (1988) *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 82:1516-1524.

Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Farkkila M, Krusius T, Kontula K. (2003) CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 52:558-62.

Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72:847-55.

Hoffmann P, Zeeh JM, Lakshmanan J, Liu L, Cooray D, Barajas L, Eysselein VE. (1997) Transforming growth factor alpha-immunoreactivity in neural tissues of the rat stomach. *Regul Pept* 69:121-5.

Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppener JW, van Amstel HK, Romeo G, et al. (1994) A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 367:375-6.

Hollenbach E, Ruhl A, Zoller M, Stremmel W (2000) T cell activation by enteric glia – A novel pathway for the amplification of inflammatory response in the enteric nervous system (abstr). *Gastroenterology* 118:A184.

Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M. (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell. Biol.* 19:6742-53.

Holzer P, Schluet W, Maggi CA. (1993) Ascending enteric reflex contraction: roles of acetylcholine and tachykinins in relation to distension and propagation of excitation. *J Pharmacol Exp Ther* 264:391-6.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. (1994) Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79:1267-76.

Hosseini JM, Goldhill JM, Bossone C, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T. (1999) Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11:347-56.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.

Hurst SM, Stanisz AM, Sharkey KA, Collins SM. (1993) Interleukin 1 beta-induced increase in substance P in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 105:1754-60.

## **-I-**

Inohara N, Nunez G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3:371-82.

Ishida Y, Maegawa T, Kondo T, Kimura A, Iwakura Y, Nakamura S, Mukaida N. (2004) Essential involvement of IFN-gamma in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. *J Immunol* 172:3018-25.

Izzo RS, Witkon K, Chen AI, Hadjiyane C, Weinstein MI, Pellicchia C. (1992) Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 87:1447-52.

Izzo RS, Witkon K, Chen AI, Hadjiyane C, Weinstein MI, Pellicchia C. (1993) Neutrophil-activating peptide (interleukin-8) in colonic mucosa from patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 28:296-300.

## **-J-**

Jefferson KK, Smith MF Jr, Bobak DA. (1999) Roles of intracellular calcium and NF-kappa B in the Clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol* 163:5183-91.

Jessen KR, Mirsky R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286:736-7.

Jessen KR, Mirsky R. (1983) Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci* 3:2206-18.

Jiang MM, Surprenant A. (1992) Re-innervation of submucosal arterioles by myenteric neurones following extrinsic denervation. *J Auton Nerv Syst* 37:145-54.

Jijon HB, Panenka WJ, Madsen KL, Parsons HG. (2002) MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C31-41.

Johal SS, Solomon K, Dodson S, Borriello SP, Mahida YR. (2004) Differential effects of varying concentrations of clostridium difficile toxin A on epithelial barrier function and expression of cytokines. *J Infect Dis* 189:2110-9.

- Johnston JA, Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Oppenheim JJ, Kevlin DJ. (1994) Human T lymphocyte chemotaxis and adhesion induced by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 153:1762-8.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55-65.
- Just I, Gerhard R (2004) Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152:23-47.
- Just I, Selzer J, Wilm M, Von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. (1995a) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375:500-503.
- Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. (1995b) The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 270:13932-13936.
- K-**
- Karlsson KA. (1995) Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 5:622-635.
- Kataeva G, Agro A, Stanisz AM. (1994) Substance-P-mediated intestinal inflammation: inhibitory effects of CP 96,345 and SMS 201-995. *Neuroimmunomodulation* 1:350-6.
- Keates AC, Castagliuolo I, Qiu B, Nikulasson S, Sengupta A, and Pothoulakis C (1998). CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274:G196-G202.
- Kelles A, Janssens J, Tack J. (2001) IL-1beta and IL-6 excite neurones and suppress cholinergic neurotransmission in the myenteric plexus of the guinea pig. *Neurogastroenterol Motil* 12:531-8.
- Kellum JM, Albuquerque FC, Stoner MC, Harris RP. (1999) Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl<sup>-</sup> secretion via afferent neurons and 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Am J Physiol* 277:G515-20.
- Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, LaMont JT et Pothoulakis C. (1994) Neutrophil Recruitment in *Clostridium difficile* Toxin A Enteritis in the Rabbit. *J Clin Invest* 93:1257-1265.
- Keranen U, Kiviluoto T, Jarvinen H, Back N, Kivilaakso E, Soinila S. (1995) Changes in substance P-immunoreactive innervation of human colon associated with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 40:2250-8.
- Khan I, Collins SM. (1994) Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 107:691-700.
- Kim JM, Kim JS, Jun HC, Oh YK, Song IS, Kim CY. (2002) Differential expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to *Clostridium difficile* toxin A. *Microbiol Immunol* 46:333-42.
- Kim M, Cooke HJ, Javed NH, Carey HV, Christofi F, Raybould HE. (2001b) D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* 121:1400-6.
- Kim M, Javed NH, Yu JG, Christofi F, Cooke HJ. (2001a) Mechanical stimulation activates Galphaq signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J Clin Invest* 108:1051-9.
- King PH, Redden D, Palmgren JS, Nabors LB, Lennon VA. (1999) Hu antigen specificities of ANNA-I autoantibodies in paraneoplastic neurological disease. *J Autoimmun* 13:435-443.
- Kirchgessner AL, Adlersberg MA, Gershon MD. (1992) Colonization of the developing pancreas by neural precursors from the bowel. *Dev Dyn* 194:142-54.
- Kirchgessner AL, Mawe GM, Gershon MD. (1990) Evaluation of the activity of chemically identified enteric neurons through the histochemical demonstration of cytochrome oxidase. *J Comp Neurol* 301:1-14.

- Koch TR, Carney JA, Go VL, Szurszewski JH. (1990) Altered inhibitory innervation of circular smooth muscle in Crohn's colitis. Association with decreased vasoactive intestinal polypeptide levels. *Gastroenterology* 98:1437-44.
- Koch TR, Carney JA, Go VL. (1987) Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 32:369-76.
- Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. (2005) Substance P-Stimulated Interleukin-8 Expression in Human Colonic Epithelial Cells Involves Protein Kinase C{delta} Activation. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1393-400.
- Krajina T, Leithauser F, Moller P, Trobonjaca Z, Reimann J. (2003) Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol* 33:1073-83.
- Krivan HC, Clark GF, Smith DF, et Wilkins TD. (1986) Cell Surface Binding Site for *Clostridium difficile* Enterotoxin: Evidence for a Glycoconjugate Containing the Sequence Gala1-3Gal,B1-4GlcNAc. *Infection and Immunity* 53:573-581.
- Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. (2002) Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35:657-69.
- Kuwahara A, Cooke HJ. (1990) Tachykinin-induced anion secretion in guinea pig distal colon: role of neural and inflammatory mediators. *J Pharmacol Exp Ther* 252:1-7.
- L-**
- Lacroix-Lamande S, Mancassola R, Naciri M, Laurent F. (2002) Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 70:2090-9.
- Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464-6.
- Larsen RD, Rivera-Marrero CA, Ernst LK, Cummings RD, Lowe JB. (1990) Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:b-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc a(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J Biol Chem* 265:7055-7061.
- Laurenzi MA, Persson MA, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A. (1990) The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand J Immunol* 31:529-33.
- Lelievre V, Muller JM, Falcon J. (1998) Adenosine modulates cell proliferation in human colonic carcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines. *Eur J Pharmacol* 341:299-308.
- Lennon VA, Sas DF, Busk MF, Scheithauer B, Malagelada JR, Camilleri M, Miller LJ. (1991) Enteric neuronal autoantibodies in pseudoobstruction with small-cell lung carcinoma. *Gastroenterology* 100:137-142.
- Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. (2003) NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 17:1465-70.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70:845-57.
- Li Y, Douglas SD, Pleasure DE, Lai J, Guo C, Bannerman P, Williams M, Ho W. (2003a) Human neuronal cells (NT2-N) express functional substance P and neurokinin-1 receptor coupled to MIP-1 beta expression. *J Neurosci Res* 74:559-66.

- Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS (2003b) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J. Neurosci.* 23:1605-11.
- Lieb K, Fiebich BL, Busse-Grawitz M, Hull M, Berger M, Bauer J. (1996) Effects of substance P and selected other neuropeptides on the synthesis of interleukin-1 beta and interleukin-6 in human monocytes: a re-examination. *J Neuroimmunol* 67:77-81.
- Limatola C, Ciotti MT, Mercanti D, Vacca F, Ragozzino D, Giovannelli A, Santoni A, Eusebi F, Miledi R. (2000) The chemokine growth-related gene product beta protects rat cerebellar granule cells from apoptotic cell death through alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. *Proc Natl Acad Sci* 97:6197-201.
- Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. (2002) Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 14:197-204.
- Linard C, Marquette C, Strup C, Aigueperse J, Mathe D. (2003) Involvement of primary afferent nerves after abdominal irradiation: consequences on ileal contractile activity and inflammatory mediator release in the rat. *Dig Dis Sci* 48:688-97.
- Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Kuipers EJ, Wilson JH, de Rooij FW. (2003) Card15 and Crohn's disease: healthy homozygous carriers of the 3020insC frameshift mutation. *Am J Gastroenterol* 98:613-7.
- Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. (2003) Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G207-16.
- Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, Mcquoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM. (2005) Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* (sous presse).
- Linden DR, Sharkey KA, Ho W, Mawe GM. (2004) Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* 15:191-205.
- Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM. (2003) Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 547:589-601.
- Lindgren S, Stewenius J, Sjolund K, Lilja B, Sundkvist G. (1993) Autonomic vagal nerve dysfunction in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 28:638-42.
- Linevsky JK, Pothoulakis C, Keates S, Warny M, Keates AC, Lamont JT, Kelly CP. (1997). IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. *Am J Physiol* 273:G1333-40.
- Lippi A, Santicioli P, Criscuoli M, Maggi CA. (1998) Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:245-51.
- Ljungdahl A, Olsson T, Van der Meide PH, Holmdahl R, Klareskog L, Hojeberg B. (1989) Interferon-gamma-like immunoreactivity in certain neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 24 :451-6.
- Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA. (2005) Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. *J Physiol* 564:863-75.
- Lu W, Maheshwari A, Misiuta I, Fox SE, Chen N, Zigova T, Christensen RD, Calhoun DA. (2005) Neutrophil-specific chemokines are produced by astrocytic cells but not by neuronal cells. *Brain Res Dev Brain Res* 155:127-34.
- Lugering N, Kucharzik T, Gockel H, Sorg C, Stoll R, Domschke W. (1998) Human intestinal epithelial cells down-regulate IL-8 expression in human intestinal microvascular endothelial cells; role of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1). *Clin Exp Immunol.* 114:377-84.

Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. (1996) Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 157:1926-34.

### -M-

MacDermott RP. (1999) Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 19:266-72.

Macdonald TT, Monteleone G. (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307:1920-5.

Madara JL. (1990) Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions. *J Membr Biol* 116:177-84.

Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. (1992) Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 82:273-5.

Mahida YR, Kurlak L, Gallagher A, Hawkey CJ. (1991) High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut* 32:1531-4.

Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP. (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* 38:337-347.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP. (1989) Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30:835-8.

Manning BP, Sharkey KA, Mawe GM. (2002) Effects of PGE2 in guinea pig colonic myenteric ganglia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1388-97.

Mantyh CR, McVey DC et Vigna SR. (2000) Extrinsic surgical denervation inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rats. *Neurosci Lett* 292: 95-98.

Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, Gomariz RP. (1998) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 63:591-601.

Maudlej N, Hanani M. (1992) Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res* 578:94-8.

Maurer M, von Stebut E. (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-6.

Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. (2004) Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:133-6.

Mawe GM, Gershon MD. (1989) Structure, afferent innervation, and transmitter content of ganglia of the guinea pig gallbladder: relationship to the enteric nervous system. *J Comp Neurol* 283:374-90.

Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C. (1994) Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 144:997-1007.

McCafferty DM, Sharkey KA, Wallace JL. (1994) Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *Am J Physiol* 266:G560-7.

McCafferty DM, Wallace JL, Sharkey KA (1997) Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat. *Am J Physiol* 272:G272-80.

Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. (2002) Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* 168:2988-96.

- Menten P, Wuyts A, Van Damme J. (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:455-81.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. (1994) IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 96:432-6.
- Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. (2004) Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 66:79-84.
- Moreels TG, De Man JG, De Winter BY, Timmermans JP, Herman AG, Pelckmans PA. (2001) Effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced ileitis on the motor function of non-inflamed rat gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil* 13:339-52.
- Morteau O, More J, Pons L, Bueno L. (1993) Platelet-activating factor and interleukin 1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 104:47-56.
- Moses PL, Ellis LM, Anees MR, Ho W, Rothstein RI, Meddings JB, Sharkey KA, Mawe GM. (2003) Antineuronal antibodies in idiopathic achalasia and gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 52:629-636.
- Mukaida N, Harada A, Matsushima K. (1998) Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:9-23.
- N-**
- Nagahama M, Semba R, Tsuzuki M, Aoki E. (2001) L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10:336-40.
- Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. (2002) Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129:5151-60.
- Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Ruhl A, Paris F, Neveu I, Naveilhan, P, Galmiche JP. (2004) Enteric glial cells : a novel regulator of intestinal epithelial cell growth (abstr) *Gastroenterology* 126:A583.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP. (2003c) Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52:84-90.
- Neunlist M, Barouk J, Michel K, Just I, Oreshkova T, Schemann M, Galmiche JP. (2003b) Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1beta-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1049-55.
- Neunlist M, Dobрева G, Schemann M. (1999) Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* 517:533-46.
- Neunlist M, Frieling T, Rupprecht C, Schemann M. (1998) Polarized enteric submucosal circuits involved in secretory responses of the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* 506:539-50.
- Neunlist M, Toumi F, Oreshkova T, Denis M, Leborgne J, Labois CL, Galmiche JP, Jarry A. (2003a) Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1028-36.
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2:1004-9.
- Newgreen D, Young HM. (2002) Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-49.

Niggli V. (2003) Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1619-38.

Nishiyama T, Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Tanikawa K. (1994) Colonic mucosal interleukin 1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Digestion* 55:368-73.

Nusrat A, Giry M, Turner JR, Colgan SP, Parkos CA, Carnes D, Lemichez E, Boquet P, Madara JL. (1995) Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 92:10629-10633.

### **-O-**

O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. (1980) Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* 124:20-4.

Okano HJ, Darnell RB. (1997) A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci* 17:3024-3037.

Olson AD, Ayass M, Chensue S. (1993) Tumor necrosis factor and IL-1 beta expression in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 16:241-6.

Olsson J, Poles M, Spetz AL, Elliott J, Hultin L, Giorgi J, Andersson J, Anton P. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines. *J Infect Dis* 182:1625-35.

O'Morain C, Bishop AE, McGregor GP, Levi AJ, Bloom SR, Polak JM, Peters TJ. (1984) Vasoactive intestinal peptide concentrations and immunocytochemical studies in rectal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 25:57-61.

Oshima S, Fujimura M, Fukimiya M. (1999) Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol* 112:257-63.

Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. (2003) Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124:1866-78.

### **-P-**

Palmer JM, Wong-Riley M, Sharkey KA. (1998) Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *Am J Physiol* 275:G922-35.

Pan H et Gershon MD. (2000) Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J Neurosci* 20:3295-309

Parhar K, Ray A, Steinbrecher U, Nelson C, Salh B. (2003) The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* 108:502-12.

Patterson CE, Daley JK, Echols LA, Lane TE, Rall GF. (2003) Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. *J Immunol* 171:3102-9.

Pawlikowski M, Zerek-Melen G, Winczyk K, Stepień H, Lachowicz A, Janecka A. (1993) Comparison of the antiproliferative effects of colon mitosis inhibitor, thyroliberin and the somatostatin analog octreotide on rat colonic mucosal epithelial cells. *Cytobios* 73:25-30.

Plaisancie P, Barcelo A, Moro F, Claustre J, Chayvialle JA, Cuber JC. (1998) Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol* 275:G1073-84.

- Pleasure SJ, Page C, Lee VM. (1992) Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 12:1802-15.
- Poli E, Lazzaretti M, Grandi D, Pozzoli C, Coruzzi G. (2001) Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis. *Neurochem Res* 26:1085-93.
- Pothoulakis C et Lamont JT. (2001) Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for microbial-Mucosal Interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G178–G183
- Pothoulakis C, Castagliuolo I, LaMont JT, Jaffer A, O'Keane JC, Snider M, and Leeman SE. (1994) CP-96,345, a specific substance P receptor antagonist inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A, but not cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 947-951.
- Pothoulakis C, Castagliuolo I, Leeman SE, Wang CC, Li H, Hoffman BJ, Mezey E. (1998) Substance P receptor expression in intestinal epithelium in clostridium difficile toxin A enteritis in rats. *Am J Physiol*. 275:G68-75.
- Pothoulakis C, Gilbert RJ, Cladaras C, Castagliuolo I, Semenza G, Hitti Y, Montcrief JS, Linevsky J, Kelly CP, Nikulasson S, Desai HP, Wilkins TD, LaMont JT. (1996) Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *J Clin Invest* 98:641–649.
- Potten CS. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 273:G253-7.
- Potten CS. (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-30.
- R-**
- Ragozzino D, Giovannelli A, Mileo AM, Limatola C, Santoni A, Eusebi F. (1998) Modulation of the neurotransmitter release in rat cerebellar neurons by GRO beta. *Neuroreport* 9:3601-6.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-41.
- Raybould HE. (2002) Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. *Gut* 51:11-14.
- Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, Bunnett NW, Vanner SJ. (2003) Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 547:531-42.
- Reed DE, Vanner SJ. (2003) Long vasodilator reflexes projecting through the myenteric plexus in guinea-pig ileum. *J Physiol* 553:911-24.
- Rehn M, Hubschle T, Diener M. (2004) TNF-alpha hyperpolarizes membrane potential and potentiates the response to nicotinic receptor stimulation in cultured rat myenteric neurones. *Acta Physiol Scand* 181:13-22.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. (1993) Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 94:174-81.
- Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flamig G, Eysselein VE, Adler G. (2000) Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 119:368-76.
- Renzi D, Mantellini P, Calabro A, Panerai C, Amorosi A, Paladini I, Salvadori G, Garcea MR, Surrenti C. (1998) Substance P and vasoactive intestinal polypeptide but not calcitonin gene-related peptide concentrations are reduced in patients with moderate and severe ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30:62-70.

- Riegler M, Castagliuolo I, Wang C, Wlk M, Sogukoglu T, Wenzl E, Matthews JB, Pothoulakis C. (2000) Neurotensin stimulates Cl(-) secretion in human colonic mucosa In vitro: role of adenosine. *Gastroenterology* 119:348-57.
- Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, Consentini E, Feil W, Schiessel R, LaMont JT, and Wenzl E. (1995) *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. *J Clin Invest* 95: 2004–2011.
- Riley TV. (2004) Nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *Curr Opin Infect Dis* 17:323-7.
- Rocha MF, Maia ME, Bezerra LR, Lyerly DM, Guerrant RL, Ribeiro RA, Lima AA. (1997) *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infect Immun* 65:2740-6.
- Roebuck KA. (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19:429-38.
- Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, Brunner M, Scholmerich J, Falk W, Andus T, Brand K. (2001) Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures. *Scand J Gastroenterol* 36:389-98.
- Rogler G. (2004) Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 20:311-7.
- Rollins BJ. (1997) Chemokines. *Blood* 90:909-28.
- Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, Pasini B, Bocciardi R, Lerone M, Kaariainen H, et al. (1994) Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367:377-8.
- Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, Laboisie C, Laburthe M, Voisin T. (2004) Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Cell* 270:45875-86.
- Roussomoustakaki M, Koutroubakis I, Vardas EM, Dimoulios P, Kouroumalis EA, Baritaki S, Koutsoudakis G, Krambovitis E. (2003) NOD2 insertion mutation in a Cretan Crohn's disease population. *Gastroenterology* 124:272-3.
- Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. (2001) Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1163-71.
- Ruhl A, Franzke S, Stremmel W. (2001) IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol Motil* 13:89-94.
- S-**
- Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, Zarzuelo A. (2002) Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflugers Arch* 444:378-88.
- Sanders DSA. (2005) Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease. *J Clin Pathol*. 58:568-572.
- Sanderson JD, Hermon-Taylor J. (1992) Mycobacterial diseases of the gut: some impact from molecular biology. *Gut* 33:145-7.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. (1999) Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-7.
- Sansonetti PJ, Arondel J, Cavaillon JM, Huerre M (1995) Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J Clin Invest* 96:884-92.

- Sansonetti PJ, Arondel J, Huerre M, Harada A, Matsushima K. (1999) Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun* 67:1471-80.
- Sartor RB. (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126:1620-33.
- Sartor RB. (2005) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21:44-50.
- Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'Brien M, Anton PM, Pothoulakis C. (2003) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology*. 125:413-20.
- Sayer B, Lu J, Green C, Soderholm JD, Akhtar M, McKay DM. (2002) Dextran sodium sulphate-induced colitis perturbs muscarinic cholinergic control of colonic epithelial ion transport. *Br J Pharmacol* 135:1794-800.
- Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. (1993) Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177:1821-6.
- Schappi MG, Smith VV, Milla PJ, Lindley KJ. (2003) Eosinophilic myenteric ganglionitis is associated with functional intestinal obstruction. *Gut* 52:752-755.
- Schemann M, Neunlist M. (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-9.
- Schicho R, Holzer P, Lippe TH. (2003) Expression of cytokines in myenteric neurons of the rat stomach (abstr). *Neurogastroenterol Motil* 15:232.
- Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M. (2001) Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 13:255-64.
- Schratzberger P, Dunzendorfer S, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. (1997a) Interleukin-8-induced human peripheral blood B-lymphocyte chemotaxis in vitro. *Immunol Lett* 58:167-70.
- Schratzberger P, Reinisch N, Prodinger WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Wiedermann CJ. (1997b) Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 158:3895-901.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hamling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A. (1999) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 353:459-61.
- Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. (2005) Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 6:376-88.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367:380-3.
- Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. (1994) Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81:85-91.
- Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. (1994) Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 82:63-9.
- Sharkey KA, Mawe GM. (2002) Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2:669-77.

- Shea-Donohue T, Goldhill JM, Montcalm-Mazzilli E, Colleton C, Pineiro-Carrero VM, Sjogren RW. (1997) Role of sensory afferents in the myoelectric response to acute enteric inflammation in the rabbit. *Am J Physiol* 273:G447-55.
- Sidhu M, Cooke HJ. (1995) Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 269:G346-51.
- Sjolund K, Schaffalitzky OB, Muckadell DE, Fahrenkrug J, Hakanson R, Peterson BG, Sundler F. (1983) Peptide-containing nerve fibres in the gut wall in Crohn's disease. *Gut* 24:724-33.
- Smith VV, Gregson N, Foggensteiner L, Neale G, Milla PJ. (1997) Acquired intestinal aganglionosis and circulating autoantibodies without neoplasia or other neural involvement. *Gastroenterology* 112:1366-1371.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. (2000) Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 47:804-11.
- Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ, Friedman W. (2004) Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J Neurosci.* 24:6482-8.
- Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara L. (1988) Pseudo-obstruction syndromes. *Baillieres Clin Gastroenterol* 2:225-254.
- Steiner TS, Flores CA, Pizarro TT, Guerrant RL. (1997) Fecal lactoferrin, interleukin-1beta, and interleukin-8 are elevated in patients with severe *Clostridium difficile* colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 4:719-22.
- Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M. (2003) Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124:1748-57.
- Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. (1992) Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 37:818-26.
- Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. (2000) NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1298-306.
- Sugimura K, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Wang D, Tang YM, Fischel-Ghodsian N, Targan SR, Rotter JI, Yang H. (2003) A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 72:509-18.
- Surrenti C, Renzi D, Garcea MR, Surrenti E, Salvadori G. (1993) Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis. *J Physiol* 87:307-11.
- Sutton I, Winer JB. (2002) The immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes. *Clin Sci (Lond)* 102:475-486.
- Swain MG, Agro A, Blennerhassett P, Stanisz A, Collins SM. (1992) Increased levels of substance P in the myenteric plexus of Trichinella-infected rats. *Gastroenterology* 102:1913-9.
- Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM. (2002) Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 51 Suppl 1:i6-10.

**-T-**

- Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. (1995) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95:1370-6.

- Teneberg S, Lonroth I, Torres Lopez JF, Galili U, Halvarsson MO, Angstrom J, Karlsson KA. (1996) Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 6:599-609.
- Thomas TK, Will PC, Srivastava A, Wilson CL, Harbison M, Little J, Chesonis RS, Pignatello M, Schmolze D, Symington J, et al. (1991) Evaluation of an interleukin-1 receptor antagonist in the rat acetic acid-induced colitis model. *Agents Actions* 34:187-90.
- Thompson JS, Nguyen BL, Harty RF. (1993) Somatostatin analogue inhibits intestinal regeneration. *Arch Surg* 128:385-9.
- Timmermans, J. P., D. Adriaensen, W. Cornelissen, D.W. Scheuermann. (1997) Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp Biochem Physiol A* 118:331-340.
- Tiscornia OM. (1977) The neural control of exocrine and endocrine pancreas. *Am J Gastroenterol* 67:541-60.
- Tjwa ET, Bradley JM, Keenan CM, Kroese AB, Sharkey KA (2003) Interleukin-1beta activates specific populations of enteric neurons and enteric glia in the guinea pig ileum and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G1268-76.
- Tomita R, Munakata K, Tanjoh K. (1998) Role of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 33:48-52.
- Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M. (2000) Peptidergic nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 47:400-4.
- Torihashi S, Ward SM, Nishikawa S, Nishi K, Kobayashi S, Sanders KM. (1995) c-kit-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 280:97-111.
- Tornblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. (2002) Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 123:1972-1979.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. (2004) Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 112:85-91.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A. (2003) Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15:239-42.
- Toumi F, Neunlist M, Denis MG, Oreshkova T, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A. (2004) Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 317:187-91.
- Trendelenburg P. (1917) Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarm Peristaltik. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 81:55-129.
- Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, O'Brien MJ, LaMont JT. (1987) Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology* 93:273-279.
- Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, Weiss R, Tiampaolo C, LaMont JT. (1989) Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. *Gastroenterology* 97:1186-1192.
- Tucker KD et Wilkins TD. (1991) Toxin A of *Clostridium difficile* Binds to the Human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect Immun* 59:73-78.

**-U-**

Uwabe KI, Matsumoto M, Nagata K. (2005) Monokine induced by interferon-gamma acts as a neurotrophic factor on PC12 cells and rat primary sympathetic neurons. *J Biol Chem* (sous presse)

**-V-**

Vanner S, Macnaughton WK. (2004) Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:39-43.

Vanner S, Surprenant A. (1991) Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pig colon. *Am J Physiol* 261:G136-44.

Vanner S, Surprenant A. (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 271:G223-30.

Vanner S. (1994) Corelease of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in guinea pig ileum. *Am J Physiol*. 267:G650-5.

Vanner S. (2000) Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G380-7.

Varilek GW, Weinstock JV, Williams TH, Jew J. (1991) Alterations of the intestinal innervation in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 77:472-8.

Vento P, Kiviluoto T, Keranen U, Jarvinen HJ, Kivilaakso E, Soynila S. (2001) Quantitative comparison of growth-associated protein-43 and substance P in ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 49:749-58.

Vergara P, Saavedra Y, Juanola C. (2002) Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol Motil* 14:35-42.

Voltz RD, Posner JB, Dalmau J, Graus F. (1997) Paraneoplastic encephalomyelitis: an update of the effects of the anti-Hu immune response on the nervous system and tumour. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:133-136.

Von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J. (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53:222-8.

**-W-**

Wakamatsu Y, Weston JA. (1997) Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* 124:3449-3460.

Wakefield AJ, Pounder RE. (1995) Measles virus in Crohn's disease. *Lancet* 345:660.

Wang D, Zhou GH, Birkenmeier TM, Gong J, Sun L, Brattain MG. (1995) Autocrine transforming growth factor beta 1 modulates the expression of integrin alpha 5 beta 1 in human colon carcinoma FET cells. *J Biol Chem* 270:14154-9.

Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. (2005) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 166:409-19.

Wang JM, Xu L, Murphy WJ, Taub DD, Chertov O. (1996) IL-8-Induced T-Lymphocyte Migration: Direct as Well as Indirect Mechanisms. *Methods* 10:135-44.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. (1994) Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 480:91-7.

Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. (2004) Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:112-7.

Warhurst AC, Hopkins SJ, Warhurst G. (1998) Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 42:208-13,1998.

Warny M et Kelly CP. (1999) Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C717-C722.

Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP. (2000) p38MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocytes necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 105:1147-1156.

Watanabe T, Kubota Y, Muto T. (1998) Substance P containing nerve fibers in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 13:61-7.

Weber E, Neunlist M, Schemann M et Frieling T. (2001) Neural components in distension-evoked secretory responses in the guinea pig distal colon. *J Physiol* 536: 741-751.

Wedel T, Krammer HJ, Kuhnel W, Sigge W. (1998) Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Pediatr Pathol Lab Med* 18:57-70.

Wedel T, Roblick U, Gleiss J, Schiedeck T, Bruch HP, Kuhnel W, Krammer HJ. (1999) Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat* 181:327-37.

Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. (2005) Human defensins in Crohn's disease. *Chem Immunol Allergy* 86:42-54.

Wilkinson PC. (1998) Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods* 216:139-53.

Wilson AJ, Byron K, Gibson PR. (1999) Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. *Clin Sci* 97:385-90.

Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* 18:4969-80.

Wood JD. (1994) Physiology of the enteric nervous system. Dans : Johnson LR, ed, Physiology of the gastrointestinal tract, 3<sup>ème</sup> édition. New York: Raven Press:423-482.

Woywodt A, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Ludwig D, Stange EF, Kirchner H. (1994) Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 5:387-95.

## -X-

Xia Y, Hu HZ, Liu S, Pothoulakis C et Wood JD (2000). *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea pig. *Gut* 46: 481-486.

Xia Y, Hu HZ, Liu S, Ren J, Zafirov DH, Wood JD. (1999) IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest* 103:1309-16.

## -Y-

Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. (1997) Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 113:1214-23.

Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F. (2003) Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. *Int Immunopharmacol* 3 :1883-7.

Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. (1993) Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 104:749-58.

Yu Y, Chadee K. (1998) Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 161:3746-52.

**-Z-**

Zhang T, Guo CJ, Li Y, Douglas SD, Qi XX, Song L, Ho WZ. (2003) Interleukin-1beta induces macrophage inflammatory protein-1beta expression in human hepatocytes. *Cell Immunol* 226:45-53.

Zhao A, McDermott J, Urban JF Jr, Gause W, Madden KB, Yeung KA, Morris SC, Finkelman FD, Shea-Donohue T. (2003b) Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol* 171:948-54.

Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, Pan A, Wu JS, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. (2002) Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. *Biochem J* 368:665-72.

Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, Wu JS, Moyer MP, Pothoulakis C. (2003a) Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1397-404.

## **INTERACTIONS ENTRE LE SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE ET LA BARRIERE EPITHELIALE INTESTINALE : MODULATION DE LA PRODUCTION NEURONALE DE CHIMIOKINES AU COURS DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE INTESTINALE.**

**Résumé :** Le système nerveux entérique (SNE) régule les fonctions du tube digestif en physiologie et en physiopathologie. Néanmoins, son rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire est inconnu. Ce travail de thèse visait à montrer, lors de l'inflammation, l'existence d'interactions entre la barrière épithéliale intestinale (BEI) et le SNE humain, régulant l'expression neuronale de chimiokines, et de caractériser les propriétés chimiotactiques des neurones. Cette étude a montré que des interactions BEI/SNE régulent l'expression neuronale d'IL-8 lors de l'inflammation, *via* l'IL-1 $\beta$  et l'activation de voies MAP kinases. De plus, les neurones induisent le chimiotactisme de cellules immunitaires, en partie *via* la sécrétion d'IL-8. Ces travaux suggèrent la participation du SNE dans la régulation de l'inflammation intestinale. Les propriétés chimiotactiques des neurones pourraient induire la formation d'infiltrats inflammatoires dans le SNE, initiant et/ou perpétuant des troubles fonctionnels intestinaux.

**Mots-clés :** système nerveux entérique, barrière épithéliale intestinale, inflammation intestinale, *Clostridium difficile*, IL-8, IL-1 $\beta$ , MAP kinases, chimiotactisme.

## **INTERACTIONS BETWEEN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM AND THE INTESTINAL EPITHELIAL BARRIER: MODULATION OF NEURONAL CHEMOKINES PRODUCTION DURING INTESTINAL INFLAMMATION.**

**Abstract:** The enteric nervous system (ENS) regulates digestive functions both in physiological and physiopathological conditions. However, its role in the control of the inflammatory response remains unknown. The aims of the study were to provide evidences for the existence of interactions between the intestinal epithelial barrier (IEB) and the ENS, regulating neuronal chemokines expression during mucosal inflammatory challenge, and to characterise the neuronal chemotactic properties. This study showed that IEB/ENS interactions increase neuronal IL-8 expression, *via* an IL-1 $\beta$ -dependent pathway and activation of MAP kinases pathways. In addition, neurones induce the chemotaxis of immune cells in part *via* IL-8 secretion. Thus, our data suggest that the ENS could play a major role in the regulation of intestinal inflammation. Furthermore neuronal chemotactic properties could be involved in the development of an inflammatory infiltrate within the ENS, initiating and/or perpetuating intestinal functional disorders.

**Key words:** enteric nervous system, intestinal epithelial barrier, intestinal inflammation, *Clostridium difficile*, IL-8, IL-1 $\beta$ , MAP kinases, chemotaxis.

**Emmanuelle TIXIER**

INSERM U539, Hôtel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44 093 NANTES cedex