

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**NEUROPATHIES ENTERIQUES :
METHODES D'EXPLORATION ET CARACTERISATION DANS UN
MODELE EXPERIMENTAL HUMAIN DE SHIGELLOSE**

THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale : Biologie et Santé
Discipline : Biologie – Médecine – Santé
Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Emmanuel CORON

Le 30 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président :

Dr Michel NEUNLIST, Directeur de Recherches INSERM, Nantes

Rapporteurs :

Pr Philippe DUCROTTE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Rouen

Pr Francis MEGRAUD, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Bordeaux

Examineur /

Pr Matthieu ALLEZ, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Paris

Directeur de thèse :

Pr Jean-Paul GALMICHE, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Nantes

REMERCIEMENTS

à **Monsieur le Docteur Michel Neunlist**, pour ton aide apportée tout au long de cette thèse, l'étendue de tes connaissances scientifiques et ton infinie patience vis-à-vis d'un clinicien partagé entre les exigences de la Clinique et de la Recherche !

à **Monsieur le Professeur Jean-Paul Galmiche**, pour m'avoir encouragé à réaliser ce travail de Recherche, et plus particulièrement pour votre rôle déterminant de moteur et de soutien tout au long de ces années passées dans votre service.

à **Monsieur le Professeur Philippe Ducrotté**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et me faire l'honneur d'être rapporteur dans ce jury.

à **Monsieur le Professeur Francis Mégraud**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et me faire l'honneur d'être rapporteur dans ce jury.

à **Monsieur le Professeur Matthieu Allez**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et me faire l'honneur d'être examinateur dans ce jury.

Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur le **Professeur Philippe Sansonetti** pour sa précieuse collaboration, son accueil au sein de l'Institut Pasteur et ses conseils avisés.

Je remercie également l'ensemble de l'INSERM U913, en particulier Mathurin Flamant, Thibault Lebouvier, Pascal Derkinderen, Bernard Lardeux, Julien Chevalier et Philippe Aubert, pour leur aide et leur sympathie.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	p5
INTRODUCTION GENERALE	p7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	p10
1. Le système nerveux entérique	p11
1.1- Découverte du système nerveux entérique (SNE) et historique	P11
1.2- Caractéristiques générales du SNE	p12
1.2.1- Organisation du SNE	p12
1.2.2- Composants cellulaires du SNE	p14
1.2.2.1- <i>Les neurones</i>	p14
1.2.2.2- <i>Les cellules gliales</i>	p16
1.2.2.3- <i>Les cellules souches</i>	p19
1.2.3- Développement du SNE	p19
1.3- Rôles du SNE dans l'homéostasie intestinale	p20
1.3.1- Contrôle de la motricité digestive par le SNE	p20
1.3.2- Contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par le SNE	p24
1.3.2.1- <i>Contrôle du transport vectoriel d'électrolytes et de mucus par le SNE</i>	p24
1.3.2.2- <i>Contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium digestif par le SNE</i>	p25
1.3.2.3- <i>Contrôle de la prolifération cellulaire de l'épithélium par le SNE</i>	p27
1.3.2.4- <i>Contrôle du flux sanguin intestinal par le SNE</i>	p27
2. Les neuropathies entériques	p29
2.1 Définition	p29
2.2 Altérations du SNE induites par l'inflammation aigüe	p30
2.2.1 Modifications anatomiques	p30
2.2.1.1 <i>Altérations des neurones dans les ganglions entériques</i>	p30
2.2.1.2 <i>Altérations des cellules gliales dans les ganglions entériques</i>	p32
2.2.1.3 <i>Modification de la cellularité dans les ganglions entériques</i>	p33
2.2.2 Modifications fonctionnelles dans les ganglions entériques	p36
2.2.2.1 <i>Plasticité du phénotype neurochimique dans les MICI</i>	p37
2.2.2.2 <i>Surexcitabilité des neurones entériques</i>	p39
2.2.3 Troubles fonctionnels liés au SNE au cours de l'inflammation intestinale	p42
2.2.3.1 <i>Altérations de la motricité du tube digestif au cours de l'inflammation</i>	p42
2.2.3.2 <i>Altérations de la sécrétion du tube digestif au cours de l'inflammation</i>	p44

3. Les méthodes d'étude du SNE	p45
3.1 Etude du SNE à partir de pièces opératoires	p45
3.2 Etude du SNE à partir de biopsies endoscopiques et chirurgicales	p46
3.3 Nouvelles méthodes d'étude du SNE	p53
3.3.1 Etude ex vivo par la technique de 'no hole full-thickness biopsy'	p53
3.3.1 Etude in vivo par dissection sous-muqueuse et endomicroscopie	p55
4. La shigellose : un modèle expérimental pour l'étude des neuropathies entériques induites par l'inflammation ?	p58
4.1 Généralités	p58
4.2 Manifestations cliniques et complications	p59
4.3 Traitement de la shigellose	p59
4.4 Lésions observées au cours de la shigellose humaine	p61
4.5 Modèles animaux de shigellose	p61
4.5.1 Modèles d'infection par les voies naturelles	p61
4.5.2 Modèles d'infection par ligature	p62
4.5.3 Autres modèles	p63
4.6 Physiopathologie de l'infection par <i>Shigella</i>	p65
4.6.1 Comment <i>Shigella</i> parvient à franchir la BEI	p65
4.6.2 Comment <i>Shigella</i> parvient à infecter les cellules épithéliales	p67
4.6.2.1 L'appareil de sécrétion de type III	p67
4.6.2.2 Les effecteurs bactériens	p67
4.6.2.3 Induction de la phagocytose	p69
4.6.3 Propagation de l'infection de cellule à cellule	p71
4.7 Conclusion et conséquences	p73
OBJECTIFS DE L'ETUDE ET RESULTATS	p74
Article 1 : Routine colonic biopsies as a routine tool to study the enteric nervous system in living patients. <i>Neurogastroenterology and motility</i> 2009	p76
Article 2 : Characterisation of early mucosal and neuronal lesions following <i>Shigella flexneri</i> infection in human colon. <i>PLoS One</i> 2009	p78
DISCUSSION GENERALE	p82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p87

ABREVIATIONS

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

ACh : acétylcholine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AH : after hyperpolarization

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BEI : barrière épithéliale intestinale

C. difficile : *Clostridium difficile*

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

FITC : fluorescein isothiocyanate

GDNF : glial-derived neurotrophic factor

GFAP : glial fibrillary-associated protein

GLP-2 : glucagon-like peptide 2

IL-X : interleukine-X

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IPAN : intrinsic primary afferent neuron

L-NAME: L-nitroarginine methylester

LPS : lipopolysaccharide

MAP kinases : mitogen-activated protein kinase

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

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

NF : neurofilament

NGF : nerve growth factor

NMDA: N-méthyl-D-aspartate

nNOS : neuronal nitric oxide synthase

NO : monoxyde d'azote

NOS : nitric oxide synthase

NSE : neuron specific enolase

PAR : proteinase-activated receptor

PCR : polymerase chain reaction

PPSE : potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur

SERT : sérotonine transporteur

SNE : système nerveux entérique

SP : substance P

TNBS : trinitrobenzene sulfonic acid

TNF α : tumor necrosis factor α

TTX : tétrodotoxine

VIP : vasoactive intestinale peptide

ZO-1: zonula occludens-1

- INTRODUCTION GENERALE -

Le système nerveux digestif entérique (SNE) est couramment appelé ‘le deuxième cerveau’ compte tenu des analogies structurelles et fonctionnelles qu’il présente avec le système nerveux central. De nombreux travaux réalisés au cours de ces trente dernières années ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental joué par le SNE dans le contrôle des fonctions digestives. Ces travaux réalisés à la fois chez l’animal mais aussi, en nombre moins important chez l’homme ont caractérisé les circuits entériques contrôlant le péristaltisme ou encore ceux impliqués dans le contrôle des fonctions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) telles que la prolifération et la perméabilité. Malgré ces progrès indéniables en Neurogastroentérologie, les dysfonctions et les altérations du SNE au cours des processus physiopathologiques restent encore largement inexplorées à ce jour. Cette situation résulte à la fois du manque de modèles animaux de pathologies humaines et aussi du peu d’études réalisées chez l’homme.

Les méthodes actuelles d’exploration du SNE humain sont très limitées. En effet, elles reposent principalement sur l’étude immunohistochimique du SNE à partir de biopsies ou pièces chirurgicales. Or, les biopsies sont réalisées ‘à l’aveugle’ par les chirurgiens pédiatres, à l’aide de pinces à biopsie rigides de type pince de Noblett ; cette technique reste donc peu diffusée et, surtout, est limitée à l’exploration du rectum par la faible longueur et la rigidité des instruments. En revanche, les pièces chirurgicales permettent une étude du SNE sur de vastes fragments intestinaux, voire autorisent une comparaison entre les territoires atteints et non atteints au sein d’un même organe. Cependant, les indications opératoires reposent généralement sur une atteinte symptomatique sévère, et concernent des pathologies très ciblées à un stade évolué de leur évolution comme les maladies inflammatoires chroniques (MICI), la pseudo-obstruction intestinale chronique (POIC) ou la maladie de Chagas. Le caractère invasif des biopsies à la pince rigide et des pièces opératoires est évidemment un facteur limitant important de l’étude du SNE au sein de pathologies digestives peu sévères, et il constitue un obstacle majeur à la constitution de groupes ‘contrôles’ pour l’étude du SNE. Afin de limiter le caractère invasif des explorations chirurgicales, il existe actuellement un développement de méthodes d’endoscopie interventionnelle et diagnostique ; elles permettent la réalisation de biopsies profondes par voie endoscopique et l’examen *in vivo* des plexus entériques à l’aide de prototypes comportant un microscope intégré à l’endoscope. Cependant, elles ne sont encore qu’à un stade très précoce de leur développement car peu diffusées et donc utilisables par de rares équipes dans le monde. Ces différentes limites techniques soulignent l’absence de méthode de caractérisation du SNE dans des conditions normales et pathologiques ‘bénignes’ chez l’homme.

De manière générale, un concept émergent en Gastroentérologie est l'existence d'une composante inflammatoire au sein d'une grande majorité de pathologies digestives. Cette inflammation peut être de haut grade comme dans les MICI et les maladies infectieuses, ou de bas grade comme dans les troubles fonctionnels post-infectieux. Un élément commun à ces pathologies inflammatoires est leur association à des lésions de la BEI. Ainsi, la BEI peut être directement la cible principale d'agents pathogènes comme *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) à l'origine de l'inflammation. Ces altérations peuvent être à l'origine de troubles digestifs tels que les rechutes dans les MICI ou la douleur dans le syndrome de l'intestin irritable, sans que l'on en connaisse précisément l'origine. Dans ce contexte général et au vu du rôle-clé joué par le SNE dans le contrôle de la BEI, une meilleure connaissance des lésions du SNE au cours des pathologies inflammatoires pourrait permettre de mieux établir leur rôle à la fois dans le contrôle de l'inflammation à la phase précoce et dans les altérations des fonctions digestives à plus long terme.

A ce titre, la shigellose peut être considérée comme un exemple type d'inflammation intestinale avec une forte composante neuronale ; cette composante est suggérée, d'une part, à la phase précoce par l'existence de crampes abdominales intenses et d'une diarrhée importante et, d'autre part, à une phase tardive par la survenue fréquente d'un syndrome de l'intestin irritable post-infectieux. De nombreux travaux ont été publiés concernant la physiopathologie de l'infection par *S. flexneri*, majoritairement à partir de modèles cellulaires ou animaux. La plupart de ces modèles sont peu pertinents et nécessitent des manipulations médicamenteuses ou chirurgicales car seul l'homme et le singe macaque peuvent spontanément développer la maladie. Les données chez l'homme sont limitées à l'étude de biopsies ou de pièces chirurgicales chez des patients symptomatiques, en général à un stade avancé de l'évolution. De plus, toutes ces études se sont intéressées aux effets de *S. flexneri* sur la BEI ou à la caractérisation de la réaction inflammatoire, mais aucune n'a évalué les effets précoces de *S. flexneri* sur la BEI ni sur le SNE. En prenant la shigellose comme modèle de pathologie inflammatoire, nous avons souhaité développer un modèle colique humain permettant de caractériser les effets précoces de *S. flexneri* sur les différentes composantes de la paroi colique humaine.

Les buts de ce travail de thèse étaient : 1) de développer une méthode permettant d'étudier en routine les neuropathies du SNE chez l'homme au cours de pathologies digestives ou extra digestives, et 2) de caractériser *ex vivo* les atteintes du SNE dans le colon humain dans un modèle inflammatoire de shigellose et d'identifier des facteurs/médiateurs responsables de ces lésions.

- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -

1- Le système nerveux entérique

1.1- Découverte du système nerveux entérique (SNE) et historique

Le SNE est un véritable ‘mini-cerveau’ situé au contact du système effecteur qu’il contrôle. En effet, plutôt que d’être localisé dans la boîte crânienne à distance du tube digestif, l’évolution au cours de la sélection naturelle a maintenu ce système nerveux tout le long des 4 mètres d’intestin grêle et 1,5 mètres de colon.

Les débuts de la neurogastroentérologie remontent à la fin du XIX^{ème} siècle par la découverte du rôle fonctionnel du SNE par W. M. Bayliss et E. H. Starling. En effet, ces auteurs ont isolé des anses d’intestin qu’ils ont soumises à une pression exercée au niveau de la lumière intestinale chez des chiens anesthésiés. 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 ont observé que le réflexe était maintenu malgré la section de tous les nerfs communiquant entre le système nerveux central et l’intestin. 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 Cajal ont permis d’établir que les neurones de l’intestin étaient de différents types morphologiques, et Dogiel les a classés 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 fonctions grâce au développement, d’une part, de techniques d’immunohistochimie et de traçage neuronal et, d’autre part, de techniques d’électrophysiologie et de neuropharmacologie.

1.2- Caractéristiques générales du SNE

1.2.1- 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 (figures 1 et 2). 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, est présent dans l'intestin grêle et le colon mais pas dans l'estomac. 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 ou plexus de Schabadach, 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. Le plexus sous-muqueux contrôle les fonctions de la muqueuse, notamment les fonctions sécrétoires de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Le plexus myentérique quant à lui contrôle 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).

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).

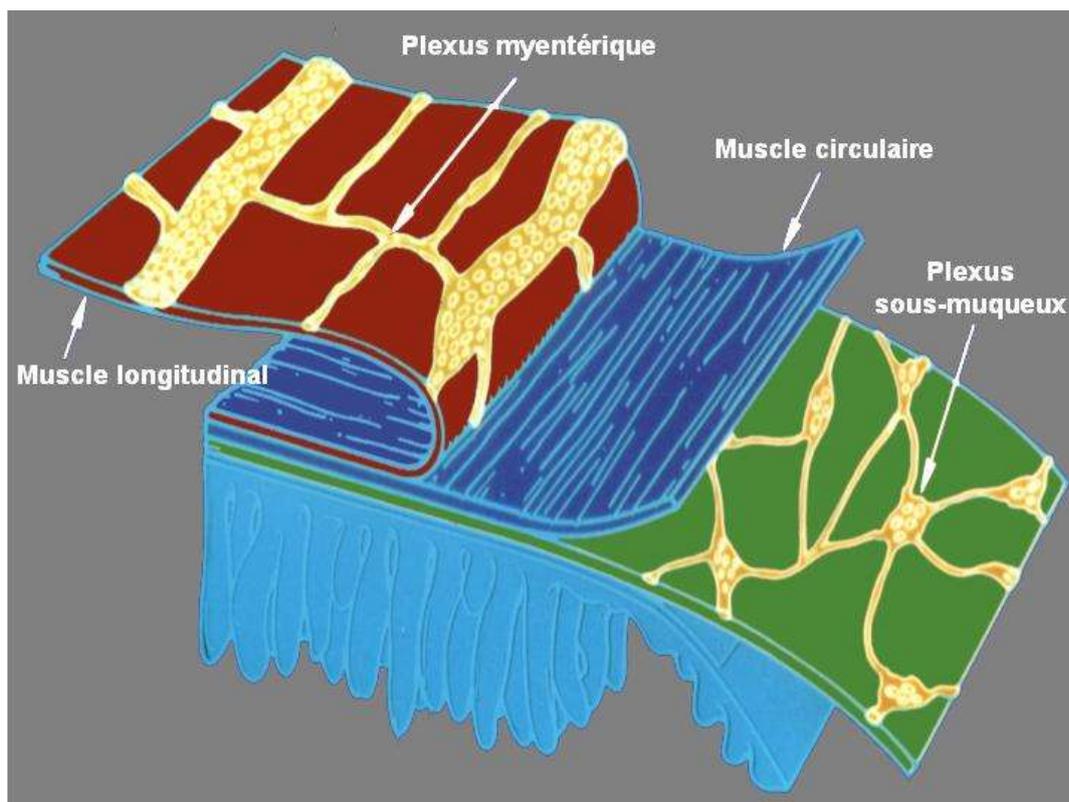


Figure 1 : Schéma simplifié de la localisation des plexus sous-muqueux et myentérique dans la paroi intestinale.

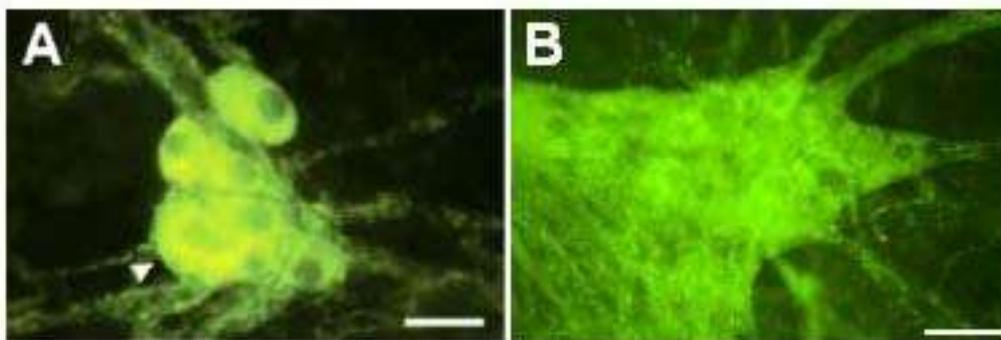


Figure 2. Marquage immunohistochimique d'un ganglion du plexus sous-muqueux (A) et du plexus myentérique (B). Les neurones sont marqués par la NSE (Neurone Specific Enolase) et révélés par un anticorps secondaire couplé au FITC. La barre d'échelle correspond à 25 μm .

1.2.2- Composants cellulaires du SNE

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

1.2.2.1- Les neurones

Le SNE contient environ 100 millions de neurones, soit autant que dans la moelle épinière. Les neurones peuvent être classés différemment selon leur morphologie, leur codage neurochimique ou leurs propriétés électrophysiologiques.

Selon leur morphologie, les neurones sont classés de Dogiel type I à VII et neurones géants. La plupart des neurones sont de type I-III (Furness, 2000) (figure 3). 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. 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 (Schemann et Neunlist, 2004). 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. 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 tétrodotoxine (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

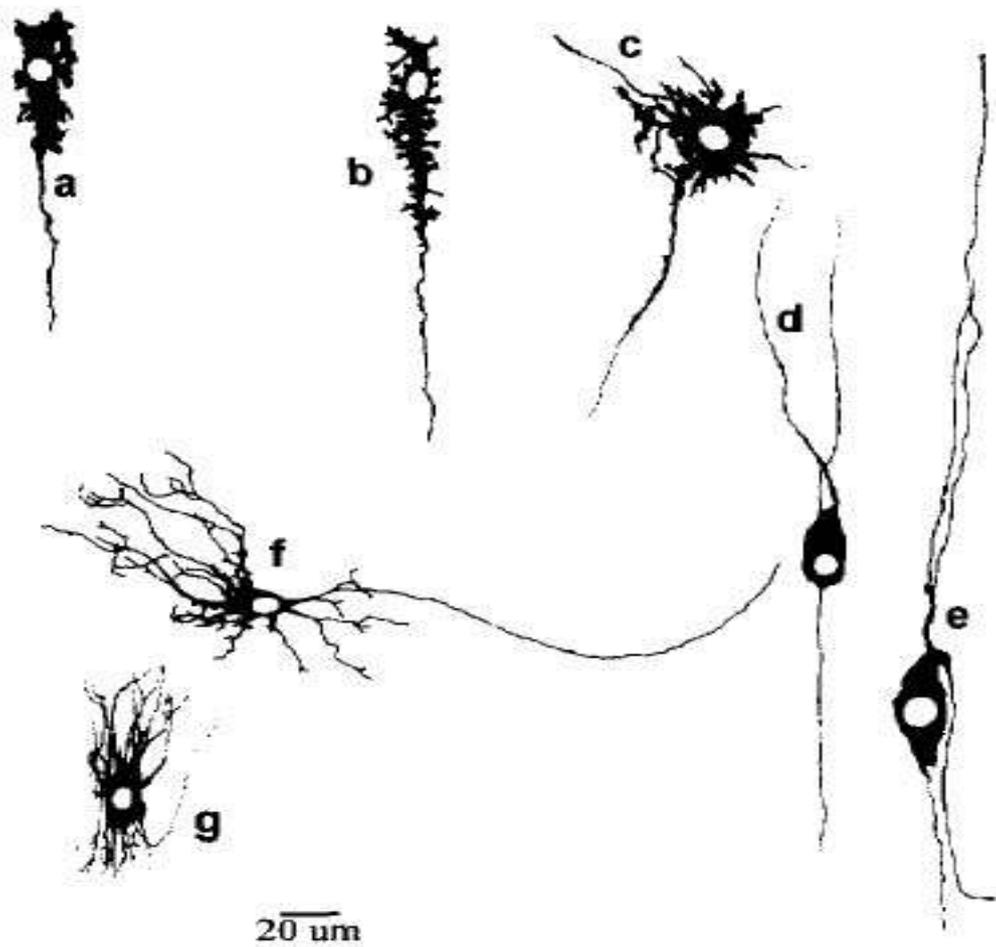


Figure 3: Principaux types morphologiques de la classification Dogiel des neurones entériques de l'intestin grêle chez le cobaye. a-c : neurones de type I, uniaxonaux multidendritiques (courtes et lamellaires ; d-e : neurones de type II, adendritiques multi-axonaux ; f : neurones de type III, uniaxonaux et multidendritiques (longues) ; g : neurones filamenteux. (d'après Timmermans et coll., 1997)

l'innervant. Ces modulations incluent des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) rapides ou lents, des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI).

1.2.2.2- Les cellules gliales

Les cellules gliales entériques (CGEs) sont 4 à 10 fois plus nombreuses que les neurones. Elles jouent un rôle structural et de soutien important dans le SNE (Hoff et coll., 2008)(figure 4). Elles se situent au niveau des ganglions où elles encerclent les neurones, et au niveau des fibres interganglionnaires et des prolongements des neurones 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 qu'elles forment des prolongements plus courts et parallèles aux fibres lorsqu'elles sont situées autour des fibres interganglionnaires (Hanani et Reichenbach, 1994). Elles expriment différents marqueurs spécifiques tels que la GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Jessen et Mirsky 1980), et S-100 β (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 β , 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 vimentine (Jessen et Mirsky 1983) et la L-arginine (Nagahama et coll., 2001). Comme le montre le tableau 1, les CGEs présentent beaucoup de similitudes avec les astrocytes du SNC. 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 suggère de plus l'implication des CGEs dans la survie des neurones, ainsi que dans la régulation des fonctions neuronales (Aubé et coll., 2006). En effet, une neurodégénérescence a été observée dans un modèle d'ablation de la glie (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 entre les neurones et les vaisseaux (Maudelj et Hanani, 1992). De plus, elles sont 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.

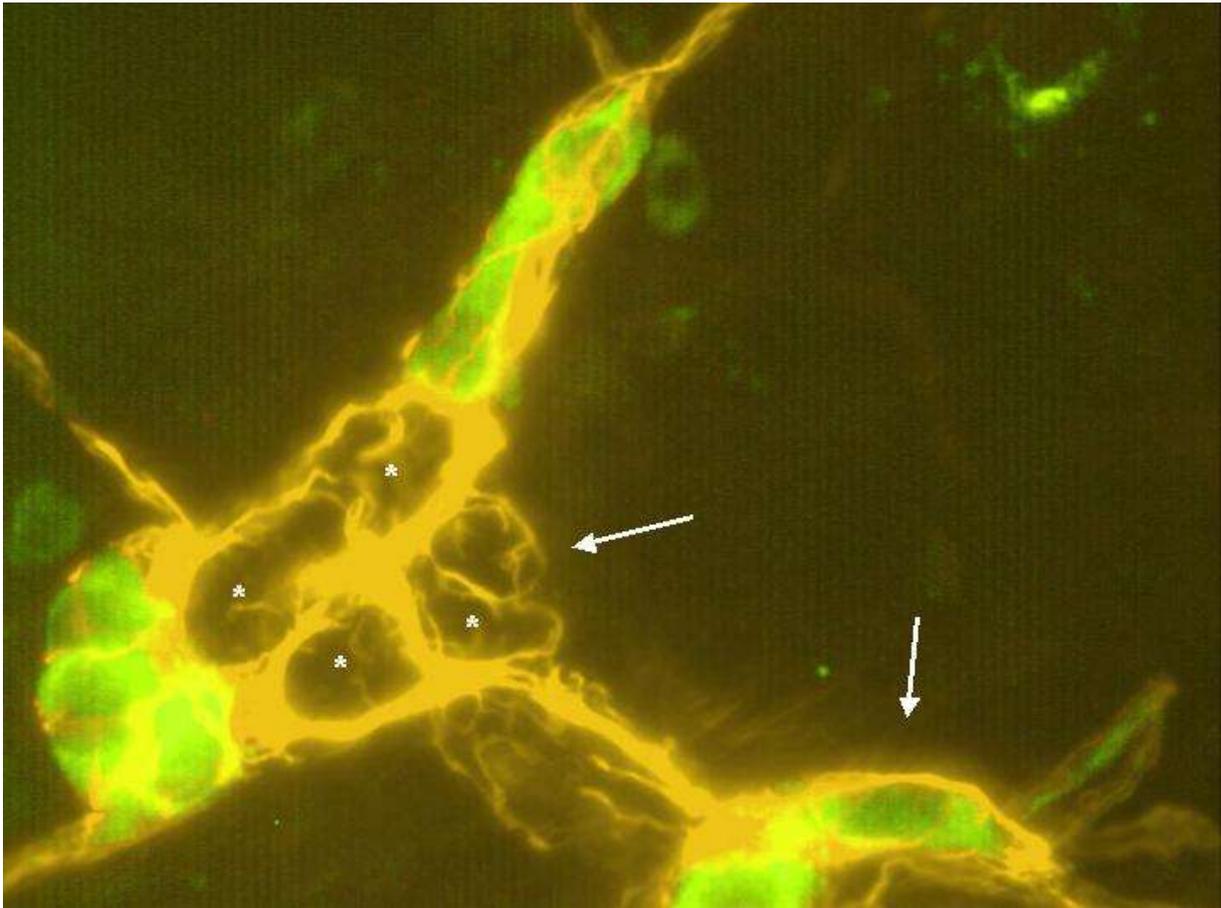


Figure 4: Marquage immunohistochimique de neurones et de cellules gliales de plexus sous-muqueux chez la souris. Les cellules gliales, immunoréactives pour la GFAP (Cy3, orange), encerclent les neurones regroupés en ganglions (flèches blanches). Les neurones paraissant en vert (FITC) immunoréactifs pour la choline acétyl transférase (ChAT), les autres (marqués d'une croix blanche) ne sont pas immunoréactifs pour la ChAT.

Tableau 1: 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"> - Forme étoilée - Grande plasticité notamment dans l'espace pérисynaptique - Deux sous-types - Forment un large syncytium couplé à des jonctions communicantes 	<ul style="list-style-type: none"> - Forme étoilée - Nombreux prolongements enveloppant les groupes de neurones - Deux sous-types - Large syncytium couple à des jonctions communicantes
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	Diminution de la résistance

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). D'autre part, des données récentes ont aussi mis en évidence le rôle des CGE dans le contrôle de la BEI. En particulier, les CGE régulent la prolifération des cellules épithéliales intestinales et augmentent la résistance de la BEI (Neunlist 2007 ; Savidge 2007).

1.2.2.3- Les cellules souches

L'existence de cellules souches neuronales entériques a été mise en évidence par Krüger et coll. (2002), chez le rat. Une fois mises en culture, ces cellules 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. D'autre part, ces cellules transplantées chez la souris *in vivo* se sont différenciées en neurones et ont permis de rétablir une fonction (Metzger et coll., 2009).

1.2.3- Développement du SNE

Le SNE dérive de cellules précurseurs des segments vagal, sacré et rostro-troncal de la crête neurale (Burns et coll., 2009). Les cellules du segment vagal colonisent tout l'intestin : celles du segment rostro-troncal colonisent l'œsophage et l'estomac et celles du segment sacré migrent uniquement vers l'intestin post-ombilical. Les cellules de la crête neurale vagale colonisent l'ensemble du tube digestif dès la 7^{ème} 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 ; celui-ci 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 précédant le front de migration des cellules de la crête neurale (Natarajan et coll., 2002). Ainsi, une altération ciblée du gène Ret chez la

souris conduit à l'aganglionose entérique et à une agenèse rénale (Schuchardt et coll., 1994). Chez l'homme, des mutations du gène Ret sont associées à des formes de mégacôlon (Romeo et coll., 1994 ; Hofstra et coll., 1994). En particulier, la maladie de Hirschprung 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 aussi 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.

1.3- Rôle du SNE dans l'homéostasie intestinale

1.3.1- 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. Ce réflexe persiste après dénervation extrinsèque (Furness et coll., 1995), montrant ainsi que le SNE contient tous les éléments nécessaires à la mise en place d'un tel réflexe, c'est à dire des neurones sensitifs, des interneurons 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 BEI et en particulier les cellules entérochromaffines qui sont les cellules sensibles primaires, par analogie avec les récepteurs gustatifs. Ainsi, 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 des neurones sensitifs intrinsèques, les IPANs (Intrinsic Primary Afferent Neuron) (Furness et coll., 1998 ; Kirchgessner et coll., 1992). Les IPANs présentent une morphologie de type II dans la classification de Dogiel et un comportement électrophysiologique de type AH (Furness, 2000). Dans l'iléon de cobaye, ils sont immunoréactifs pour la ChAT, la SP et la calbindine (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). Récemment, Bertrand et Bornstein (2002) ont montré que l'ATP pouvait 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). En effet, les IPAN sont 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'interneurons 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). La transmission synaptique vers les neurones moteurs excitateurs est assurée par l'ACh et les tachykinines (récepteur NK₃) (Bornstein et coll., 2004). Parmi les trois types d'interneurons descendants, dont l'axone projette dans la direction anale, le groupe d'interneurons ChAT/NOS/VIP est impliqué dans le réflexe péristaltique tandis que le groupe ChAT/SOM est impliqué dans la propagation 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, 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 5.

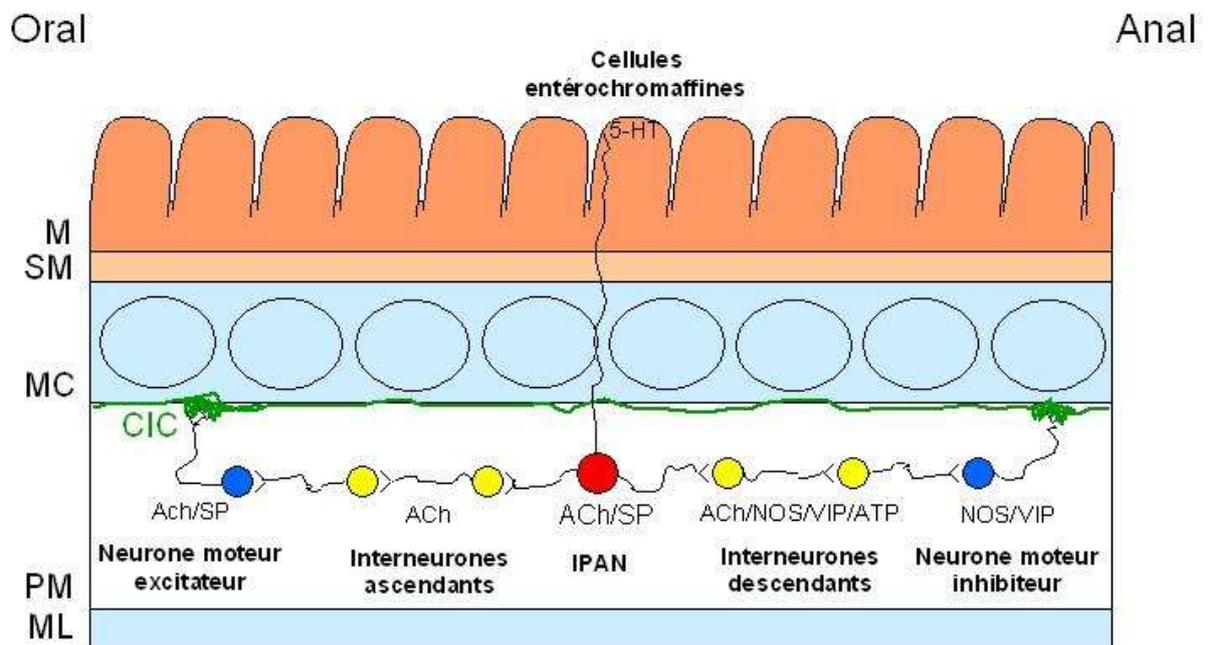


Figure 5: Schéma des voies nerveuses intrinsèques impliquées dans le réflexe péristaltique. M : muqueuse ; SM : sous-muqueuse ; MC : muscle circulaire ; PM : plexus myentérique ; ML : muscle longitudinal ; CIC : cellules interstitielles de Cajal.

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

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

Plusieurs études ont montré que des stimuli mécaniques comme la distension de la muqueuse colique chez le cobaye et l'homme induisent la sécrétion d'électrolytes, qui est bloquée par la TTX et 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 et l'activation de récepteurs mécanosensibles. Il en résulte l'activation des terminaisons nerveuses sensibles impliquant les tachykinines et des voies cholinergiques (Kuwahara 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 6.

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).

1.3.2.2- Contrôle de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium digestif par le SNE

Plusieurs études 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 était inhibée par la TTX. De même, le jeûne du porcelet entraînait une augmentation de la perméabilité au niveau du jéjunum, qui était 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 a été montré dans un système de coculture composé de sous-muqueuse humaine et de la lignée épithéliale colique HT-29 clone 16^E. Dans ce modèle, la stimulation électrique des neurones sous-muqueux diminuait la perméabilité de l'épithélium et augmentait l'expression de ZO-1, molécule-clé des jonctions serrées. Cet effet passait par l'activation de voies VIPergiques (Neunlist et coll., 2003a).

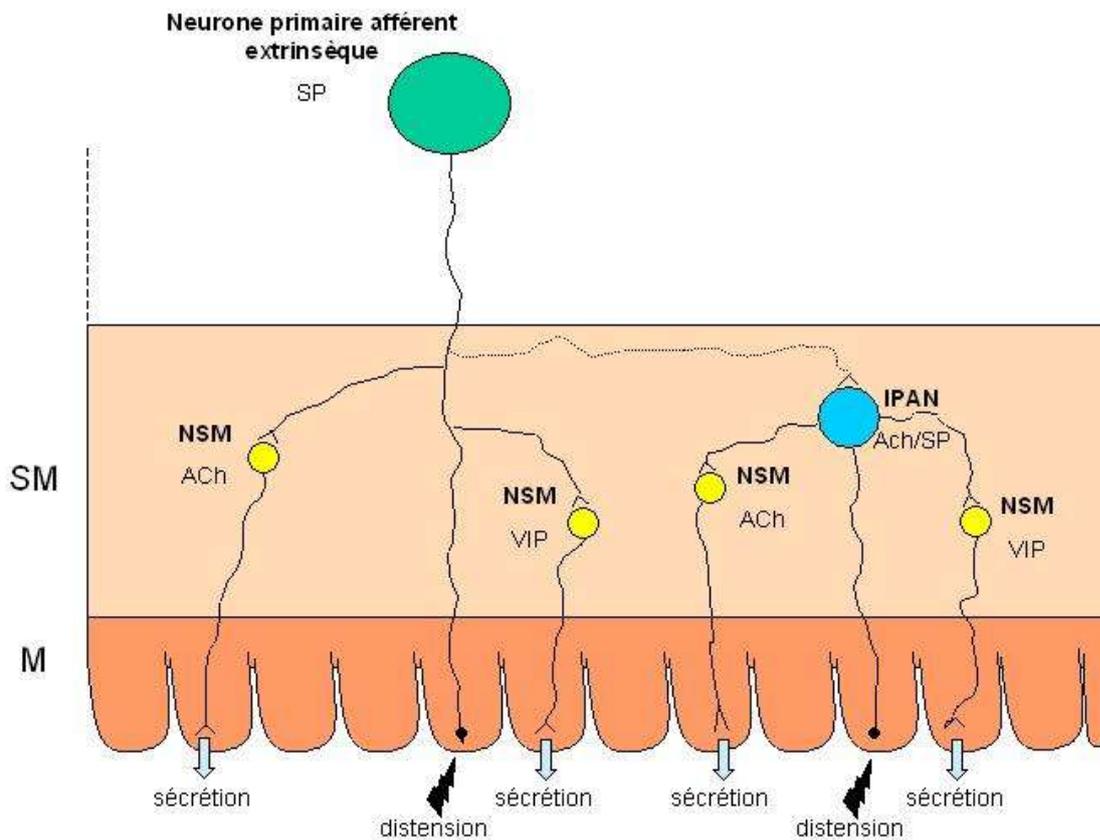


Figure 6: Circuits neuronaux impliqués dans le contrôle nerveux de la sécrétion d'électrolytes chez le cobaye. SM : sous-muqueuse ; M : muqueuse ; NSM : neurone sécrétomoteur. (d'après Weber et coll., 2001).

L'effet direct de neuromédiateurs sur la perméabilité de la BEI 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 diminuait la perméabilité tandis que l'acétylcholine l'augmentait. Hällgren et coll. (1998) ont quant à eux montré que la neurokinine A augmentait la perméabilité dans le duodénum de rat, effet qui est inhibé par le VIP. Ces résultats suggèrent que le VIP a des effets protecteurs de la BEI notamment vis-à-vis d'agents pathogènes.

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

Le SNE est aussi capable de contrôler la prolifération et la différenciation de la BEI. Ainsi, 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 BEI, étaient médiés par le SNE. En effet, le GLP-2 induit la prolifération et la différenciation de cellules épithéliales intestinales, effets qui sont bloqués par la TTX. De plus, les effets du GLP-2 sont associés à une activation de c-fos. Le SNE est aussi capable de contrôler directement la prolifération des cellules épithéliales intestinales. 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 diminuait 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).

1.3.2.4- 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, 1991 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-HT₃ et 5-HT₄, suggérant l'implication de voies dépendantes de la sérotonine dans l'activation des IPAN sous-muqueux (dotés du récepteurs 5-HT₄) et des IPAN myentériques (dotés du récepteurs 5-HT₃) (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.

2- Les neuropathies entériques

2.1-Définition

Le terme de neuropathies du système nerveux entérique a été récemment établi par différents auteurs pour décrire et englober l'ensemble des lésions du SNE observées dans un grand nombre de pathologies digestives, mais aussi extra-digestives. Les neuropathies entériques peuvent être directement responsables de pathologies digestives comme la maladie de Hirschprung ou l'achalasia, ou encore secondaires à la maladie. Dans ce dernier cas elles sont néanmoins responsables de troubles digestifs associés à ces pathologies, en particulier dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou la maladie de Parkinson. Ces neuropathies entériques sont caractérisées par la présence simultanée ou non de trois grandes catégories de lésions du SNE : 1) des lésions structurelles, 2) des modifications du phénotype neurochimique (i.e. contenu en neuromédiateurs/enzymes), et 3) des modifications des propriétés électrophysiologiques.

La grande majorité des neuropathies entériques sont associées à des processus inflammatoires qui sont soit localisés au sein du SNE (ganglions entériques), soit qui affectent le tube digestif d'une manière plus générale. L'inflammation joue donc un rôle central dans le développement des neuropathies entériques. Dans ce contexte, la réponse du SNE à des stimuli inflammatoires dépend de plusieurs paramètres tels que la durée et l'intensité de l'inflammation (ie aiguë vs chronique), le phénotype de la réponse inflammatoire (Th1 vs Th2, Th17), la localisation de l'inflammation (colon vs iléon). Dans cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés aux neuropathies entériques survenant dans les conditions d'un processus inflammatoire aigu.

2.2- Altérations du SNE induites par l'inflammation aigue

2.2.1- Altérations anatomiques

2.2.1.1- Altérations des neurones dans les ganglions entériques

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 (De Giorgio et coll., 2004).

Une multitude d'études histologiques ont montré des anomalies de la structure des plexus et des cellules neuro-gliales 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 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 des MICI (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 maladie de Crohn ou de 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 dans les neurones, la glie et les cellules T (Von Herbay et coll., 1992). 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 affirmer 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 2.

Tableau 2 : Principales anomalies morphologiques du SNE observées au cours des MICI chez l'homme. (d'après Geboes et Collins, 1998 et Neunlist et coll., 2007)

Critère	Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
<u>Fibres nerveuses</u>		
Hypertrophie (muqueuse, sous-muqueuse)	+++	-
Hyperplasie	++	+
Domage axonal	++	+
<u>Corps cellulaire neuronal</u>		
Normal		
Hypertrophie	++	+
Hyperplasie	++	+
Domage	++	+
+ Présent - Absent		

L'étude des modèles inflammatoires aigus 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, le nombre de 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. Il est bloqué par du sérum anti-neutrophiles (Boyer et coll., 2005). Au cours de l'infection par *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), une atteinte des ganglions a également été observée, s'accompagnant parfois de cellules apoptotiques à l'intérieur des ganglions (Bogers et coll., 2000). Parmi les autres facteurs responsables de ces processus neurodégénératifs figure le stress oxydant (Lourenssen et coll., 2009). Ainsi, H₂O₂ induit une dégénérescence

rapide des neurones entériques par des processus à la fois apoptotiques et nécrotiques (Lourenssen et coll., 2009).

2.2.1.2- Altérations des cellules gliales dans les ganglions entériques

Les cellules gliales entériques (CGE) sont également une cible cellulaire de l'inflammation intestinale. Ainsi, chez des patients atteints d'entérocolite nécrosante, 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 rapportée dans des biopsies de patients atteints de maladie de Crohn (Cornet et coll., 2001). Inversement une augmentation significative de l'expression de la GFAP (Cornet et coll., 2001) ainsi que de la S100 β a été observée dans la RCH (Cirillo et coll., 2009). Au cours de l'inflammation induite par le TNBS chez le cobaye, une prolifération des CGE mais pas des neurones entériques a été observée au sein du plexus myentérique (Bradley et coll., 1997). De plus, les CGE semblent être la cible de médiateurs pro-inflammatoires car l'IL-1 β , le TNF α et le LPS induisent une augmentation du nombre de cellules gliales GFAP positives, à la fois en culture et sur des préparations tissulaires (Von Boyen et coll., 2004). La conséquence fonctionnelle des modifications phénotypiques des CGE induites par l'inflammation reste cependant largement inconnue. Néanmoins, un nombre croissant d'études suggère que les CGEs pourraient directement participer aux processus inflammatoires, au même titre que les astrocytes dans le système nerveux central. En effet, les CGE répondent à différents médiateurs inflammatoires. En particulier, l'IL-1 β augmente l'expression et la sécrétion d'IL-6 par les CGEs de rat (Ruhl et coll., 2001). En outre, les CGEs peuvent probablement aussi agir comme des cellules présentatrices d'antigènes. En effet, elles expriment de manière constitutive le CMH de classe I (Geboes et coll., 1992) mais dans les états inflammatoires, en particulier dans la maladie de Crohn, on observe une induction et expression de CMH de classe II dans les CGE des plexus sous-muqueux et myentérique. Cette expression pourrait être associée à l'infiltration de cellules T au voisinage des CGEs caractéristiques des plexites entériques observées dans les MICI (cf paragraphe suivant). D'autre part, le traitement des CGE par le TNF α et d'IFN γ induit l'expression de CMH de classe II (Hollenbach et coll., 2000).

2.2.1.3- Modification de la cellularité dans les plexus entériques

De nombreux processus inflammatoires aigus sont associés à la présence d'infiltrats de cellules immunitaires au sein des plexus entériques (pour revue voir De Giorgio et coll., 2004). D'une manière générale ces infiltrats inflammatoires semblent affecter principalement le plexus myentérique mais peuvent également être présents au sein des plexus sous-muqueux, sans que l'on en connaisse précisément l'origine. La formation de ces infiltrats est souvent associée à une neurodégénérescence et peut parfois conduire à une complète disparition des neurones (figures 7 et 8) (De Giorgio et coll., 2002 ; Smith et coll., 1997 ; Tornblom et coll., 2002).

De manière surprenante, la nature précise de ces infiltrats (lymphocytes T CD4 ou CD8; mastocytes), en particulier dans les MICI, reste à ce jour mal connue. Néanmoins leur valeur prédictive du risque de rechute a récemment été suggérée (Ferrante et coll., 2006), même si des résultats contradictoires ont été rapportés (Ng et coll., 2009). Par exemple, Ferrante et coll., (2006) ont montré que les infiltrats inflammatoires au sein du SNE étaient associés à une augmentation du risque de rechute post opératoire. Des données plus nombreuses sont disponibles concernant des modèles animaux, inflammatoires ou infectieux. Ainsi 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). En outre, la nature de l'infiltrat inflammatoire évolue au cours du temps ; en effet, 1-3h après le traitement au TNBS on observe un infiltrat composé principalement de neutrophiles ou d'éosinophiles (Linden et coll., 2005 ; Pontell et coll., 2009) alors qu'aux temps plus tardifs on observe un afflux de lymphocytes T pouvant persister plus d'une semaine. Chez des souris infectées par *S. mansoni*, la formation d'un infiltrat inflammatoire constitué de granulocytes et de lymphocytes a été identifiée au niveau du plexus myentérique (Bogers et coll., 2000). Enfin, *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*) induit une dégénérescence des neurones entériques associée à des infiltrats inflammatoires composés d'éosinophiles, de neutrophiles, de mastocytes, et de lymphocytes dans un modèle porcin (Balemba et coll., 2001).

Ces infiltrats inflammatoires ne sont pas exclusivement observés au cours d'inflammation aiguë mais peuvent aussi être rapportés lors de pathologies inflammatoires de « bas grade » ou dans des pathologies motrices non inflammatoires. Ainsi, chez des patients ayant un SII, un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes T mais pas de mastocytes, a

été observé au sein des plexus myentériques de l'intestin grêle chez 9/10 patients et ce malgré l'absence d'anomalies manométriques (Tornblom et coll., 2002).

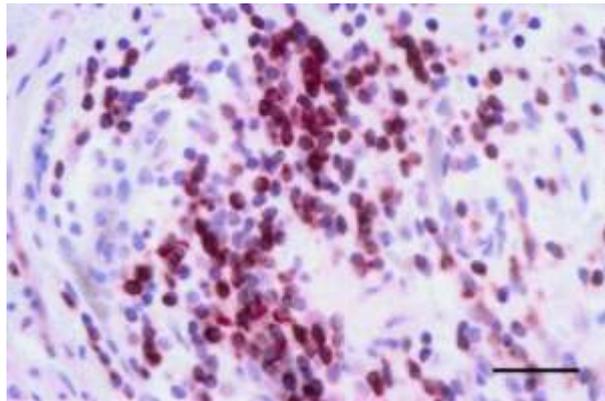


Figure 7 : Accumulation de lymphocytes CD3+ au sein du plexus myentérique du côlon gauche d'une femme de 55 ans présentant un mégacôlon idiopathique. Echelle : 25 μ m. (De Giorgio et coll., 2004)

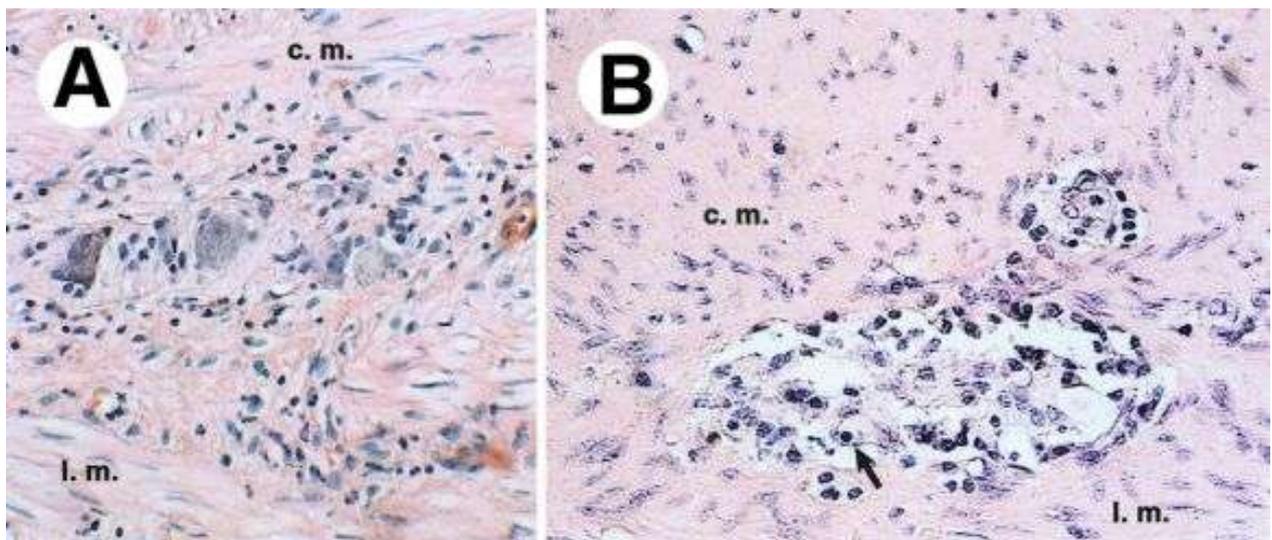


Figure 8 : Coupe d'iléon d'un patient de 20 ans atteint de pseudo-obstruction intestinale chronique. La photo A (x200) a été prise quelques années avant la photo B (x250). Les deux photos montrent une importante infiltration de lymphocytes qui peut conduire à une baisse du nombre de neurones myentériques (B). (De Giorgio et coll., 2002).

Enfin, de nombreux troubles de la motricité digestive sont aussi associés à la présence d'infiltrats inflammatoires au sein des plexus myentériques. Les manifestations cliniques de ces plexites affectent l'ensemble du tube digestif en partant de l'œsophage et en allant jusqu'au colon. Ainsi la présence d'infiltrats inflammatoires a été observée dans l'achalasia, les gastroparésies et les vomissements incoercibles, la pseudo obstruction intestinale chronique ou le mégacolon idiopathique (De Giorgio et coll., 2004).

Au cours de ces 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). Une étude récente a montré que l'exposition de cultures neuronales (neuroblastome SH-SY5Y et culture primaire de neurones myentériques) à du sérum de patients atteints d'un syndrome paranéoplasique contenant des anti-Hu activait des voies de signalisation proapoptotiques (caspase 3 et apaf-1) et induisait la dégénérescence des neurones entériques. Cette dégénérescence pourrait être directement responsable des troubles de la motricité digestive observés chez ces patients (De Giorgio et coll., 2003).

2.2.2- Modifications fonctionnelles dans les ganglions entériques

L'étude du contenu en neuromédiateurs ou leur enzyme de synthèse dans le SNE ont révélé l'existence de profondes altérations du phénotype neurochimique du SNE au cours des neuropathies entériques, principalement lors des pathologies inflammatoires intestinales. Ces études ont été réalisées chez l'homme et dans des modèles animaux de pathologies humaines en utilisant des méthodes immunohistochimiques, dosage Elisa ou tests radioimmunologiques. Concernant les études chez l'homme, les données sont souvent contradictoires. Ces différences résultent probablement de la diversité des méthodes et techniques utilisées (coupe vs paroi entière), et de l'hétérogénéité des patients étudiés (âge, sexe, durée de la maladie, traitement). En outre, ces études sont souvent limitées aux formes sévères de la maladie et ne permettent pas le suivi des modifications du phénotype au cours de

l'évolution de la maladie. Dans ce contexte, la nécessité de développer de nouvelles méthodes d'étude du SNE et de l'étendre à toutes les formes de la pathologie est particulièrement importante.

2.2.2.1- Plasticité du phénotype neurochimique dans les MICI

Au cours de la maladie de Crohn, différentes études ont montré 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 (figure 9) (Belai et coll., 1997 ; Schneider et coll., 2001 ; Boyer et coll., 2007). 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 s'étendre aux 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). Ces résultats discordants peuvent être liés au stade 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 tyrosine 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, des 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., 2003b). Cette altération du codage neurochimique a également été observée à distance de l'inflammation, dans des zones macroscopiquement non inflammatoires (Neunlist et coll., 2003b). De manière intéressante, cette augmentation de SP a aussi été observée dans le SNE et dans les DRG dans un modèle d'inflammation intestinale induite par un nématode, ie. *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) (De Giorgio et coll., 2001 ; Swain et coll., 1992). L'IL-1 β serait responsable de la régulation de la synthèse de la SP dans ce modèle (Hurst et coll., 1993).

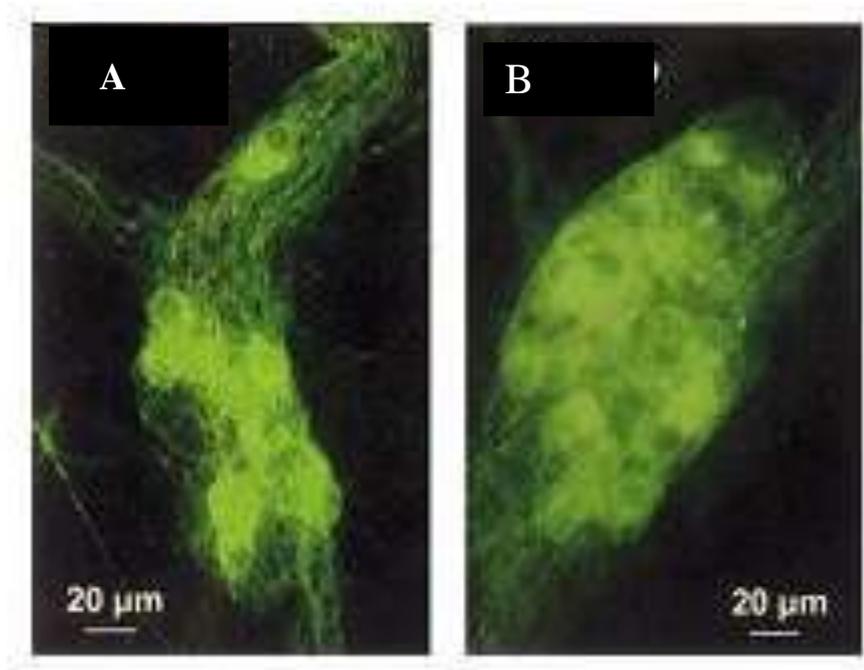


Figure 9 : Marquage immunohistochimique de ganglion sous-muqueux chez des patients contrôles (A) et atteints de maladie de Crohn (B). Le nombre de neurones immunoréactifs pour le VIP est augmenté chez les patients atteints de MC comparativement aux contrôles. (Schneider et coll., 2001).

Dans un modèle inflammatoire au TNBS, une augmentation semblable de l'expression de SP était observée dans le colon pendant la phase aigue de l'inflammation. Cette augmentation persistait durant la phase post-inflammatoire tout au long de l'étude (ie > 3 mois) (Simpson et coll., 2008). D'autre part, dans un modèle identique de colite induite par *T. spiralis*, aucune modification de la proportion de neurones ChAT-IR n'a été rapportée (Auli et coll., 2008).

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 *S. mansoni* (Varilek et coll., 1991) et chez des porcs infectés par *S. japonicum* (Balemba et coll., 2001).

2.2.2.2- *L'inflammation entraîne une surexcitabilité 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 3.

Tableau 3 : Stimuli responsables d'une augmentation de l'excitabilité des neurones entériques.

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

Plusieurs études *in vivo* menées chez l'animal ont montré que l'inflammation s'accompagne d'une hyperexcitabilité des neurones entériques, indépendamment de leur sous-type (S vs AH). Au cours de l'infection par *T. 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). Par ailleurs, Xia et coll., (2000) ont montré que la toxine A du *C. difficile* altérait le comportement électrophysiologique (dépoliarisation et augmentation de l'excitabilité) et les neurotransmissions adrénrgiques 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 induisaient l'hyperexcitabilité de neurones sous-muqueux chez le cobaye. Dans des modèles inflammatoires au TNBS, 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) du côté post-synaptique (Lomax et coll., 2005).

Chez l'homme, une étude réalisée en culture organotypique a montré que l'infection par la toxine B du *C. difficile* induisait l'expression de c-fos dans une population de neurones sous-muqueux coliques VIP-immunoréactifs. Cet effet de la toxine B est indirect, contrairement à celui de la toxine A, et est médié par l'IL-1 β (Neunlist et coll., 2003c). D'autres études ont aussi montré que l'IL-1 β et l'IL-6, à des doses nanomolaires, augmentaient l'excitabilité des neurones sous-muqueux intestinaux du cobaye, caractérisée par la dépoliarisation 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 β et l'IL-6 suppriment les PPSI. Ces deux cytokines conduiraient donc, en outre, à la suppression de l'activité inhibitrice de la noradrénaline sur les neurones sécrétomoteurs, ce qui pourrait contribuer à la physiopathologie des diarrhées sécrétoires (Xia et coll., 1999). L'effet excitateur de l'IL-1 β et de l'IL-6 a été reproduit par Kelles et coll. (2001) 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 β et l'IL-6. Le TNF α 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. PGE₂ augmente l'excitabilité des neurones AH et S du plexus myentérique de l'iléon de rat (Dekkers et coll., 1997). Linden et coll. (2004) ont de plus montré que Cox-2 contribuait à l'augmentation de l'excitabilité des neurones myentériques AH, associée aux troubles de la motricité, observée au cours de l'inflammation induite par le TNBS chez le cobaye.

2.2.3- 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 des modèles animaux ; elles concernent principalement 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, au moins en partie, responsable. 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).

2.2.3.1- Altérations de la motricité du tube digestif au cours de l'inflammation

Un nombre croissant d'études suggère que dès la libération de la sérotonine par les cellules entérochromaffines et sa fixation 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., 2003). Cette étude a de plus montré que l'expression de la protéine et des ARNm du transporteur SERT était diminuée dans les entérocytes de cobaye traités 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 dépendaient 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 était 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 augmentait l'excitation des voies non-cholinergiques et provoquait 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 était diminuée et la relaxation du muscle longitudinal altérée à cause d'une inhibition de la neurotransmission non adrénergique 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 était augmentée. Cette étude suggère donc que les troubles de la motricité, dans ce modèle, résultent 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., 2003; Akiho et coll., 2002). De même, après l'infection des souris par *S. 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). Une étude a ainsi montré que les macrophages étaient 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; Akiho et coll., 2002). En particulier, l'IL-1 β diminue la réponse contractile induite par l'acétylcholine dans le jéjunum par une voie dépendante du VIP (Aube et coll., 2001).

2.2.3.2- 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 inhibait 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 ; cet effet est sensible à la TTX (Sayer et coll., 2002). Il n'est pas bloqué par l'atropine mais par l'héxaméthonium, suggérant l'implication des voies cholinergiques nicotinérgiques.

3- Méthodes d'étude du SNE

Une méthode idéale pour étudier le SNE chez l'homme, en particulier les plexus sous-muqueux et myentérique, devrait être facilement acceptée par le malade et avoir un risque nul ou très faible de complications. Elle devrait pouvoir permettre une analyse à la fois morphologique et fonctionnelle du SNE, et si besoin être répétée afin d'étudier une pathologie à divers stades de son évolution. Une telle méthode n'existe pas à l'heure actuelle.

Les méthodes d'étude chez l'animal répondent à certains de ces critères : accès aisé aux tissus, choix d'un plexus en fonction de la pathologie d'intérêt, possibilité d'études morphologiques et/ou fonctionnelles. Cependant, certaines pathologies ne sont pas représentées au sein des modèles animaux, et il est rare de pouvoir répéter les expérimentations dans le temps car les animaux sont le plus souvent sacrifiés afin de fournir le tissu nécessaire à l'étude.

Chez l'homme, l'obstacle majeur est l'obtention de tissu digestif en quantité suffisante pour étudier le SNE car les pathologies concernées sont le plus souvent fonctionnelles, et requièrent donc rarement une résection chirurgicale. De plus, lorsqu'elle est décidée, la chirurgie s'adresse au stade ultime de l'évolution (De Giorgio et coll., 2004 ; Neunlist et coll., 2003b). De ce fait, aucune donnée n'est disponible concernant les altérations précoces chez l'homme des neuropathies entériques, ni leur évolution au cours du temps. Enfin, les pièces opératoires, obtenues *ex vivo* dans des conditions métaboliques particulières, sont dévascularisées lors de l'étude du SNE, et ne reflètent sans doute pas la réalité physiologique.

3.1- Etude du SNE à partir de pièces opératoires

Peu de données sont en réalité disponibles chez l'homme concernant les résultats obtenus à partir des pièces opératoires, elles concernent seulement certaines pathologies telles que les MICI, la maladie de Hirschprung ou la maladie de Chagas (Geboes et coll., 1998 ; Neunlist et coll., 2003b; Munakata et coll., 2002 ; da Silveira et coll., 2009). L'avantage des pièces opératoires est de permettre un marquage immunohistochimique dans plusieurs territoires différents ; ils peuvent ainsi être comparés en terme de lésions du SNE. Par exemple, da Silveira et coll. (2009) ont utilisé les pièces de colectomie de patients opérés pour mégacolon chronique après infection de Chagas et comparé les segments dilatés et non dilatés. Par analyse immunohistochimique à l'aide des protéines S100, GFAP, anti-protéine C et anti-

protéine D, ils ont montré que la perte neuronale était identique dans les segments dilatés et dans les segments non dilatés. Cependant, ils ont constaté une hyperexpression de la GFAP dans les segments non dilatés par rapport aux segments dilatés et aux patients non infecté ceci suggère que cette hyperexpression de la GFAP précéderait la survenue de la perte neuronale et la dilatation colique, et exercerait un rôle protecteur au cours de la maladie de Chagas.

3.2- Etude à partir de biopsies endoscopiques et chirurgicales

Des méthodes moins invasives que la chirurgie d'exérèse ont été développées mais sont encore assez peu répandues. Ces méthodes sont représentées par les différentes variantes de biopsies, soit par pince souple, soit par biopsie rigide, soit au moyen d'instruments chirurgicaux, ces derniers étant utilisés pour réaliser des biopsies à partir de la face séreuse vers la face muqueuse au cours d'une laparoscopie.

L'intérêt majeur des pinces à biopsie endoscopiques souples, qui peuvent passer par le canal opérateur d'un endoscope, est de pouvoir accéder à la totalité des segments du tube digestif. Cependant, malgré leur utilisation extrêmement fréquente en routine, leur capacité à étudier le SNE n'a jamais été évaluée en dehors d'une seule étude. Dans une étude publiée en 1995, Mathan et coll. rapportaient l'observation de fibres nerveuses en microscopie électronique, à partir de biopsies duodénales obtenues chez des patients atteints de choléra (Mathan et coll., 1995). Cependant, ces auteurs n'ont pas évalué les ganglions entériques par cette méthode.

Les pinces à biopsie rigides sont beaucoup plus utilisées (figure 10A), et leurs résultats sont connus de longue date, notamment pour établir le diagnostic de maladie de Hirschprung chez les nourrissons. Par exemple, la possibilité d'étudier le plexus d'Auerbach par des biopsies rectales réalisées quelques centimètres au-dessus de la ligne pectinée est connue depuis les travaux de Swenson et coll. en 1955. Les pinces à biopsies rigides actuelles permettent d'obtenir des biopsies satisfaisantes dans 96%, mais sont réservées aux enfants de plus de 6 mois en raison du risque perforatif chez les nouveaux-nés (Alizai, J Pediatr Surg 1998). Une alternative a été développée en 1969 par Noblett et coll. (J Pediatr Surg), consistant en un tube rigide muni d'un canal d'aspiration et d'une lame de scalpel. Cependant, le nombre de biopsies non contributives est élevé, de l'ordre de 10 à 20%, même si des modifications récentes (amélioration de l'ergonomie, utilisation de lame à usage unique) (figure 10B) ont permis de diminuer ce taux à 7% (Hall, J Pediatr Surg 2009). Surtout, quel

que soit l'instrument utilisé, ces pinces à biopsies ou systèmes d'aspiration sont limités à l'exploration du rectum du fait de leur faible longueur et de leur rigidité.

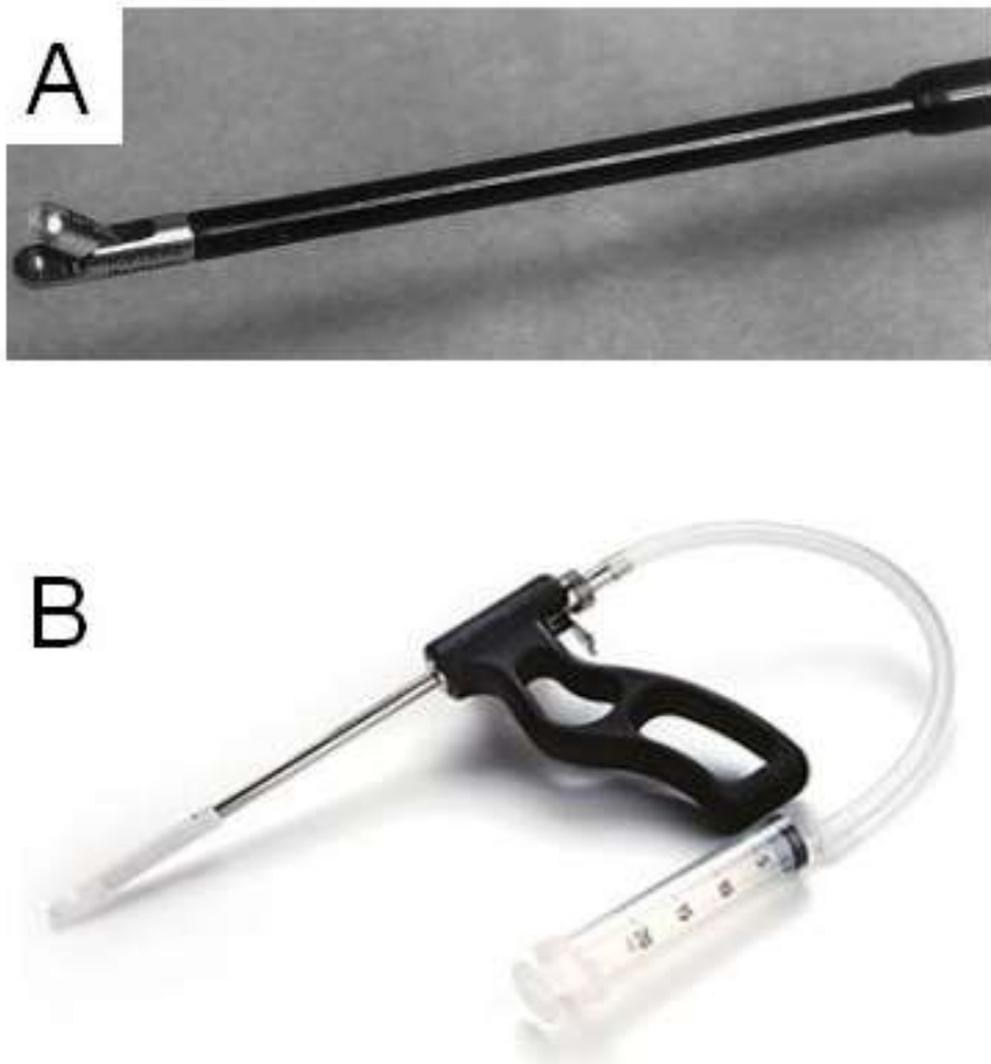


Figure 10 : Pince à biopsie rigide et système d'aspiration permettant la réalisation de biopsies rectales profondes. (A) Pince à biopsie rigide standard (modèle Storz). (B) système d'aspiration nouvelle génération (modèle rbi2). Ce dernier modèle est muni d'un système d'aspiration et d'une lame de bistouri à usage unique pour capturer et couper le fragment tissulaire. (d'après Alizai et coll ., 1998 ; Hall et coll., 2009).

Les biopsies chirurgicales, réalisées selon différentes modalités techniques, ont permis d'importantes avancées dans l'exploration du SNE. En particulier, les troubles moteurs sévères du tube digestifs font appel à ces techniques qui permettent d'analyser l'ensemble de la paroi digestive et donc les plexus sous-muqueux et myentérique. Si la majorité des prélèvements sont maintenant réalisés par laparoscopie plutôt que par laparotomie, différentes techniques de biopsies ont été proposées. Ainsi, King et coll. (2005) ont mis au point une stratégie de prélèvements par deux trocards de 5 mm mis en place par voie transombilicale, permettant la réalisation de biopsies coliques étagées (angle droit, colon transverse, angle gauche, sigmoïde) (figure 11). Dans une série de 197 enfants (âge moyen de 8 ± 4 ans) explorés pour une constipation, ces auteurs ont rapporté un taux de perforation post-opératoire de l'ordre de 1%, d'évolution favorable après suture lors d'une 2^{ème} laparoscopie. La rentabilité de la technique était satisfaisante puisque 44% des patients avaient des altérations immunohistochimiques du SNE, caractérisées par une réduction de l'expression de la substance P et du VIP. Carvalho et coll. (2001) ont également montré des résultats intéressants chez 7 enfants explorés pour maladie de Hirschprung, grâce à des biopsies chirurgicales laparoscopiques des colons droit, transverse, et gauche.

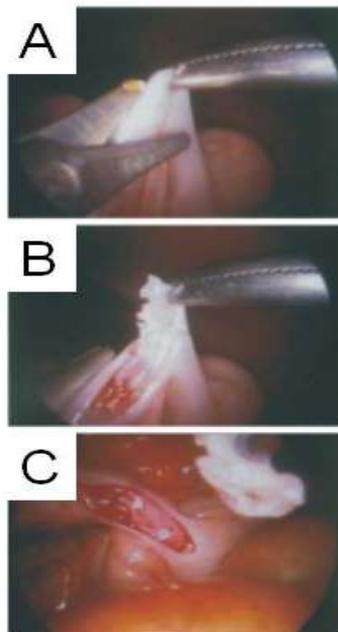


Figure 11 : Biopsie séromusculaire obtenue par laparoscopie. Une bandelette colique est saisie à l'aide d'une pince (A) puis excisée tangentielle en emportant un fragment du muscle circulaire sous-jacent (B). La photographie du site de prélèvement montre l'absence de perforation muqueuse (C). (d'après King et coll ., 2005).

La possibilité de réaliser des prélèvements biopsiques du SNE ouvre non seulement des perspectives diagnostiques mais également d'importantes perspectives thérapeutiques. Ainsi, Metzger et coll. (2009) ont récemment démontré non seulement la possibilité d'obtenir des cellules souches neuronales (CSN) à partir de biopsies d'intestin humain post-natal, mais aussi celle de greffer ces CSN sur des explants de patients atteints de maladie de Hirschprung. Les biopsies étaient réalisées chez des enfants de 9,2 ans en moyenne au cours d'endoscopies standard et ont été comparées à des biopsies chirurgicales 'fullthickness'. La caractérisation de 12 de ces biopsies obtenues par endoscopie montrait que : 1) sur le plan morphologique, seules 3 sur 9 contenaient de la sous-muqueuse, les autres étant constituées de muqueuse isolée, et 2) l'immunomarquage par Tuj1 révélait un important réseau neuronal fait de fibres nerveuses et de corps cellulaires dans la muqueuse de toutes les biopsies (figure 12). Mises en culture, les biopsies endoscopiques permettaient l'obtention de CSN sous forme d'agrégats isolés dès le cinquième jour de culture, et de 'neurosphere like bodies' (NLBs) dès le dixième jour de culture sans différence de taille ou de nombre des NLBs par rapport à ceux obtenus par biopsies chirurgicales (figure 13). Outre l'obtention de CSN, les auteurs ont démontré la capacité des CSN ainsi cultivées à coloniser un segment aganglionique d'intestin humain ; en effet, le marquage immunohistochimique réalisé au septième jour sur les segments provenant de patients opérés pour maladie de Hirschprung montrait l'existence d'agrégats de NLBs formant un réseau de connexions neuronales (figure 14).

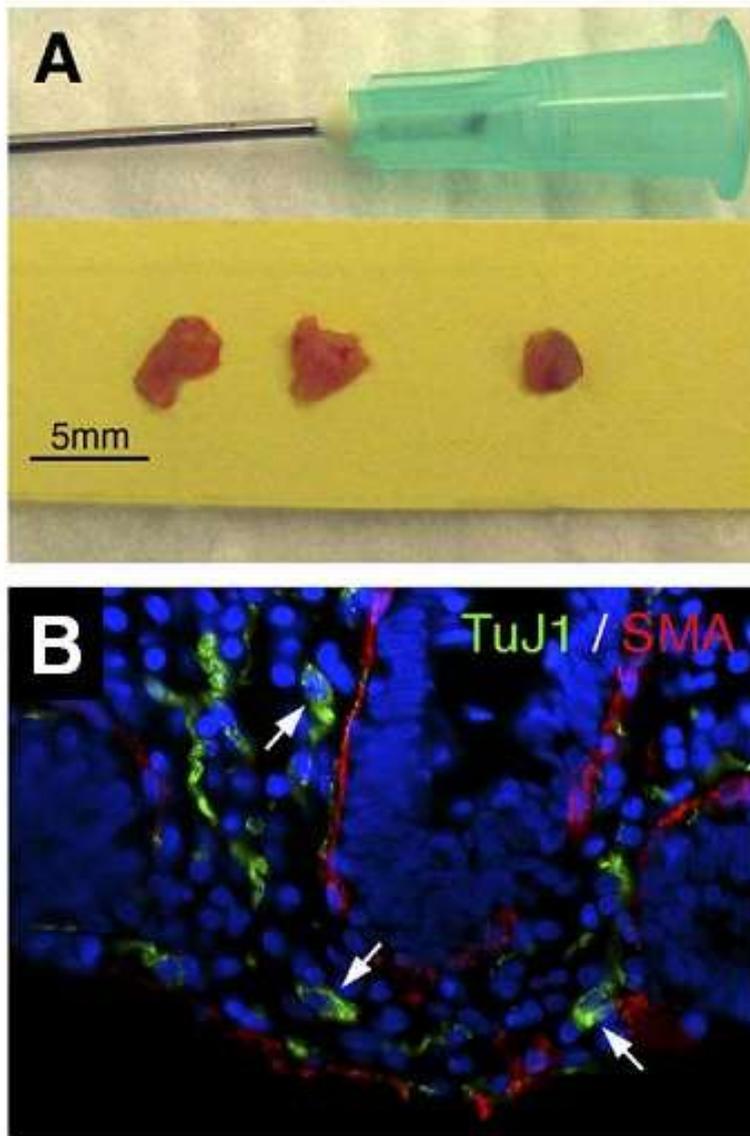


Figure 12 : Biopsies muqueuses contenant des cellules souches neuronales (CSN).
(A) Spécimens biopsiques (2-4 mm) obtenus au cours d'une endoscopie standard. (B) Marquage immunohistochimique à l'aide d'anticorps dirigés contre l'actine (SMA) et Tuj1, montrant la présence de fibres musculaires lisses (en rouge) et de corps cellulaires neuronaux (en vert) (d'après Metzger et coll., 2009).

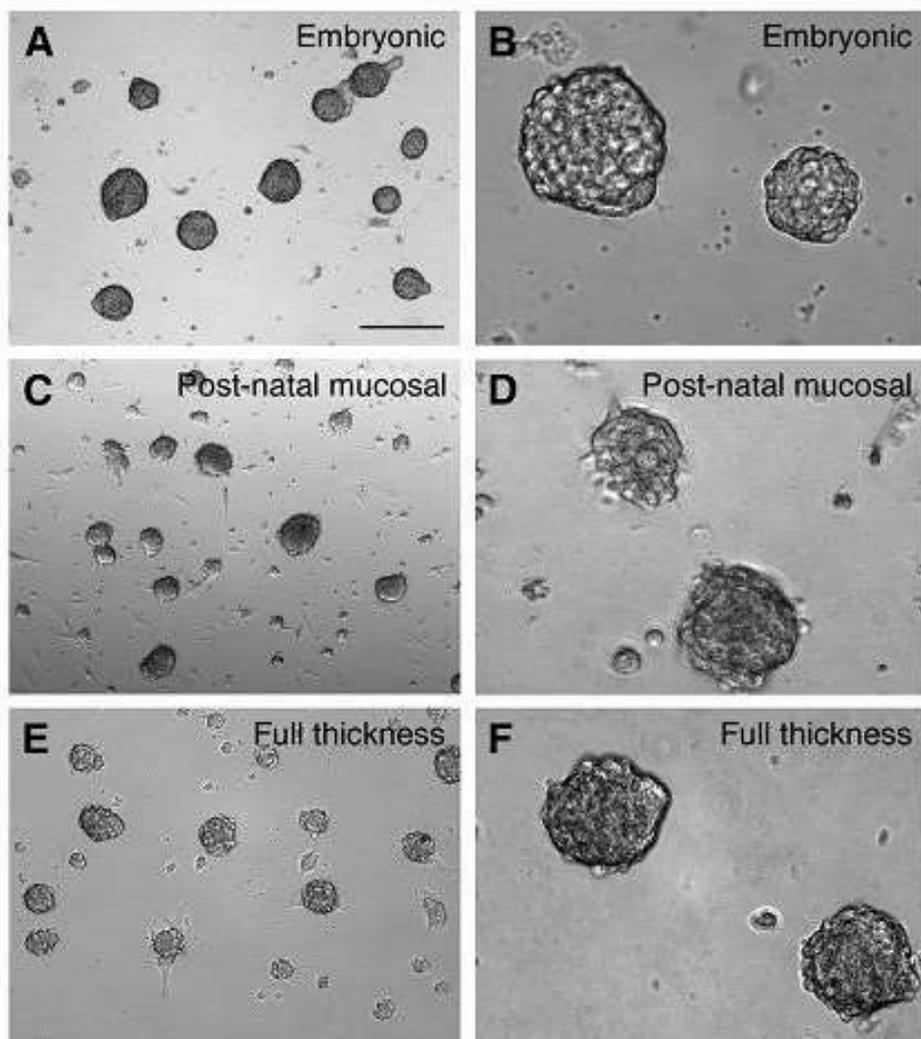


Figure 13 : Neurosphères contenant des cellules souches neuronales, obtenues à J10 après culture primaire intestinale (A-F). Ces neurosphères ont été cultivées à partir d'intestin embryonnaire humain [(A) faible grossissement et (B) fort grossissement], de biopsies intestinales [(C) faible grossissement et (D) fort grossissement] et d'explants tissulaires [(E) faible grossissement et (F) fort grossissement] (d'après Metzger et coll., 2009).

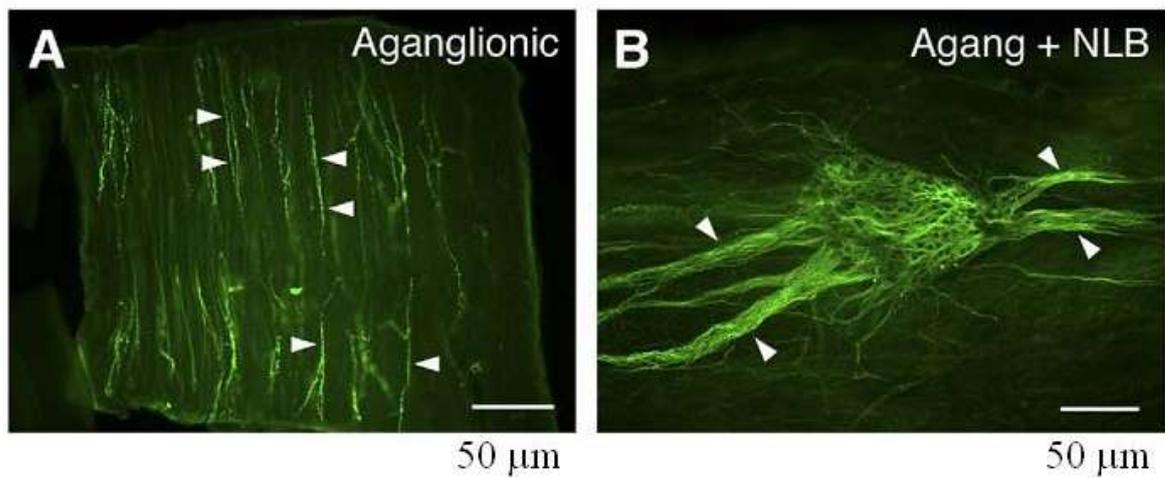


Figure 14 : Explants tissulaires maintenus en culture seuls (A) puis en présence de neurosphères (B). (A) Le marquage immunohistochimique par Tuj1 montre la présence de rares fibres nerveuses parallèles aux cellules musculaires lisses. (B) Après culture pendant 5 jours en présence de neurosphères, le marquage immunohistochimique réalisé chez le même patient montre la présence d'extensions nerveuses correspondant à une colonisation de l'explant par les neurosphères (d'après Metzger et coll ., 2009).

3.3- Nouvelles méthodes d'étude du SNE

3.3.1- Etude *ex vivo* par double mucosectomie ('no hole' full-thickness biopsy)

Le choix d'un instrument devrait, à l'avenir, dépendre du type de plexus à analyser. En effet, du fait de sa situation beaucoup plus superficielle, le plexus sous-muqueux est plus facilement accessible par voie endoscopique alors que le plexus myentérique requiert des biopsies chirurgicales par voie laparoscopique.

Parmi les techniques en voie de développement, il est nécessaire de souligner l'importance de l'endoscopie interventionnelle. Afin d'obtenir une biopsie de l'intégralité de la paroi gastrique sans recourir à une intervention chirurgicale, certains auteurs ont proposé le développement d'une nouvelle technique endoscopique de résection muqueuse appelée 'endoscopic [no hole] full-thickness biopsy' (Rajan et coll., 2008). Cette technique consiste à réaliser deux mucosectomies superposées en limitant le risque perforatif par la pose préalable d'anses largables et de systèmes d'ancres métalliques (figure 15). Ce système a été évalué *in vivo* dans un modèle porcin où toutes les biopsies ainsi réalisées contenaient du plexus myentérique. Cependant, des perforations retardées survenaient chez 2 des 6 animaux ayant eu la procédure, dûes à des dislocations des anses largables ou métalliques. En pratique, cette procédure actuellement à haut risque de complication nécessitera des améliorations significatives et une morbidité quasi nulle avant de pouvoir être envisagée comme une technique diagnostique potentielle d'étude du SNE.

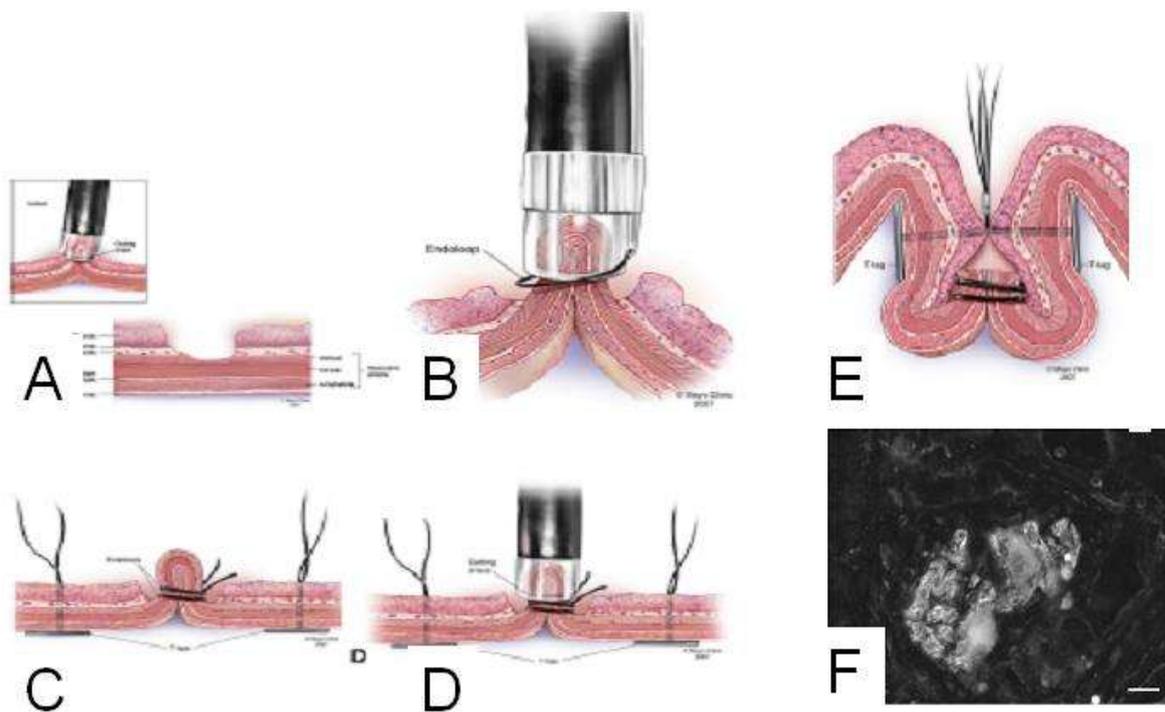


Figure 15 : Technique de double mucosectomie gastrique *in vivo* chez l'animal pour prélèvement et l'étude du plexus myentérique par voie endoscopique.

(A) Une première mucosectomie est réalisée au capuchon, sans injection sous-muqueuse préalable, permettant de mettre à nu la muscularis propria. (B) L'intégralité de la paroi gastrique sous-jacente est ensuite aspirée dans le capuchon, créant ainsi un pseudopolype, et une anse largable de type Endoloop est mise en place à la base de ce pseudopolype afin de sécuriser la coupe. (C) Des ancras métalliques de type T-tag sont placées en position adjacente au pseudopolype. (D) Une deuxième mucosectomie est réalisée sur le pseudopolype, emportant ainsi l'intégralité de la paroi gastrique dont le plexus myentérique. (E) Les ancras métalliques sont mises en tension afin de mettre en contact la séreuse de part et d'autre de la zone de résection. (F) Marquage immunohistochimique à l'aide d'anticorps dirigés contre nNOS montrant l'existence de neurones immunoréactifs nNOS au sein d'un ganglion myentérique sur le fragment tissulaire résecté (d'après Rajan et coll., 2008).

3.3.2- Etude *in vivo* par dissection sous-muqueuse et endomicroscopie

Récemment, de nouvelles méthodes d'étude de la muscularis propria ont été proposées comme alternative aux biopsies chirurgicales de type 'full thickness'. Le principe de ces nouvelles méthodes est d'obtenir une imagerie *in vivo* de la muscularis propria et du plexus myentérique. Cette imagerie a été rendue possible par la miniaturisation de microscopes optiques, appelé 'endomicroscopes. L'intérêt de ce type d'imagerie, outre son caractère mini-invasif par rapport à une biopsie chirurgicale, est de permettre une plus grande surface d'exploration afin de minimiser le risque d'erreur d'échantillonnage. Deux types d'endomicroscopes existent : le premier type concerne des microscopes à fluorescence, fibrés ou non, c'est à dire pouvant passer par le canal opérateur d'un endoscope (système Mauna Kea Technologies) ou intégrés à un endoscope (système Pentax). A notre connaissance aucune donnée n'a encore été publiée concernant les possibilités d'imagerie de la sous-muqueuse par ces microscopes à fluorescence. En revanche des études sont en cours ou ont été récemment publiées pour visualiser *in vivo* les neurones myentériques à l'aide d'un autre type d'endomicroscope, ie. l'endocytoscope (système Olympus). L'endocytoscope est constitué d'un faisceau de fibres optiques de 3,4 mm de diamètre qui sont connectées à une lentille grossissante à l'extrémité en contact avec le tissu, et à une source lumineuse et un processeur à l'autre extrémité (figure 16A). Ainsi, Sumiyama *et coll.* (Sumiyama et coll., 2009) ont étudié la muscularis propria gastrique dans un modèle porcin par endocytoscopie. Dans cette étude, l'accès endoscopique à la muscularis propria était obtenu soit par résection muqueuse 'classique' c'est à dire par dissection sous-muqueuse, soit par une nouvelle technique de valve sous-muqueuse créée endoscopiquement. La dissection sous-muqueuse consiste à réséquer la muqueuse et la partie superficielle de la sous-muqueuse à l'aide de différents modèles de couteaux endoscopiques (pour revue, voir Kantsevov et coll., 2008). La sous-muqueuse est donc mise à nu et l'application de l'endocytoscope permet alors d'obtenir des images de la sous-muqueuse et de la muscularis propria.

Une autre voie d'abord de la sous-muqueuse pour réaliser une imagerie *in vivo* avec l'endocytoscope est la technique de valve sous-muqueuse, concept développé initialement dans la chirurgie endoscopique transluminale par les orifices naturels (NOTES) (Sumiyama et coll., 2008). Cette technique consiste à dilater l'espace sous-muqueux à l'aide d'un ballon de dilatation endoscopique de 13mm après injection sous-muqueuse de 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium (C₂H₅NaO₃S₂)(MESNA). Le MESNA appartient à la classe des composés thiols comportant un groupe sulfhydryl actif. Il agit en dissolvant les

ponts disulfure du tissu connectif situé entre les différents plans anatomiques, et prépare ainsi la dissection endoscopique obtenue par le ballon de dilatation grâce à son action chimique préalable. Le ballon de dilatation est glissé dans l'espace sous-muqueux après une courte incision de 5 mm par un infundibulotome. L'espace ainsi créé après dilatation permet d'introduire un coloscope muni de l'endocytoscope afin d'imager la muscularis propria (figures 16B et C).

Sumiyama *et coll.* ont utilisé ces 2 techniques d'accès endoscopique et ils ont conclu à la supériorité de la technique de valve qui permet une imagerie optimale des couches musculaires, probablement grâce à une diffusion plus homogène des colorants utilisés (bleu de toluidine, crystal violet, bleu de méthylène, sondes spécifiques Neurotrace et FM 1-43 FX). Les deux sondes utilisées étaient la sonde Neurotrace (Molecular probes, Eugene, Ore) qui se lie à la substance de Nissl exclusivement située dans les corps des neurones, et la sonde FM 1-43FX. Cette dernière est une sonde membranaire cationique fluorescente qui se fixe dans les terminaisons nerveuses et a été utilisée pour identifier les neurones myentériques dans les modèles animaux de souris. L'intérêt de combiner ces 2 sondes est de visualiser à la fois le cytoplasme et les terminaisons nerveuses des neurones myentériques. Sumiyama *et coll.* ont ainsi pu identifier des cellules musculaires lisses à l'aide du bleu de toluidine, et des cellules montrant des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques de neurones myentériques. Ces auteurs concluent à partir de cette étude à la faisabilité de créer par voie endoscopique un espace sous-muqueux afin de visualiser *in vivo* la muscularis propria et ses composantes neuronales. Cette étude, si elle était confirmée, ouvre de nouvelles perspectives dans le diagnostic des pathologies motrices du tube digestif, et pourrait devenir le futur standard en remplaçant la biopsie chirurgicale.

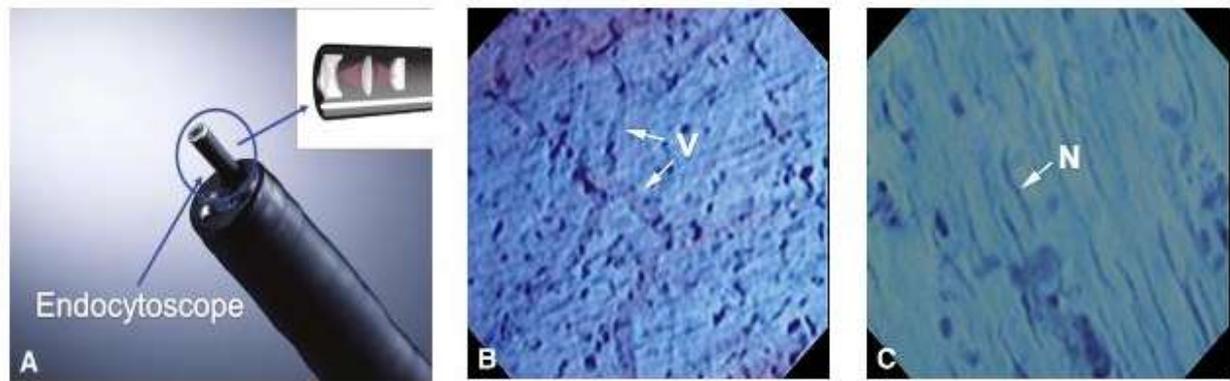


Figure 16 : Etude de la muscularis propria *in vivo* par endocytoscopie chez l'animal.

(A) Endocytoscope. Il s'agit d'un microscope fibré de 3,4 mm de diamètre pouvant passer par le canal opérateur d'un coloscope. Une lentille grossissante (x450 ou x1100) permet d'imager le tissu avec lequel elle est en contact, préalablement marqué au bleu de méthylène.

(B) Vue endocytoscopique de la muscularis propria à un grossissement x450 ; les vaisseaux sont clairement identifiables (V) de même que les fibres musculaires lisses.

(C) Vue endocytoscopique de la muscularis propria à un grossissement x1100 ; les corps cellulaires ainsi que les noyaux (N) des cellules musculaires lisses sont visualisables *in vivo*.

(d'après Sumiyama et coll., 2009)

4- La shigellose : un modèle expérimental pour l'étude des neuropathies entériques induites par l'inflammation ?

4.1- Généralités

La shigellose (aussi appelée dysenterie bacillaire) est responsable de plus de 160 millions de cas annuels dont 1 million de morts, principalement chez les enfants en bas âge, et représente donc toujours un problème de santé public majeur. Elle est causée par des entérobactéries du genre *Shigella*, responsables de diverses manifestations allant de la diarrhée aiguë à un syndrome dysentérique caractérisé par une diarrhée aiguë glairo-sanglante. L'homme en est le seul réservoir. *Shigella* se transmet par voie féco-orale, le plus souvent de façon directe du malade à son entourage. L'eau et les aliments souillés par des déjections contenant *Shigella* peuvent également transmettre la maladie. Les shigelles sont extrêmement infectieuses puisque 10 à 100 bacilles suffisent à provoquer la maladie (Ménard et coll., 1996).

On dénombre 4 espèces constituant le genre *Shigella* : 1) *S. flexneri* qui comprend 6 sérotypes et représente l'espèce majoritaire dans les pays en voie de développement, 2) *S. sonnei* (1 sérotype) surtout présente dans les pays industrialisés, 3) *S. dysenteriae* (16 sérotypes) et 4) *S. boydii* (8 sérotypes). Les deux premières espèces sont responsables de la forme endémique de la maladie. La distribution géographique et la pathogénicité des quatre espèces sont différentes (Sansone et coll., 2006). Dans les pays en voie de développement, on retrouve une forte incidence de *S. flexneri* avec une prédominance du sérotype 2a. Endémique dans certaines zones, cette espèce est responsable de 32 à 58% des cas (Kotloff et coll., 1999; Talukder 2001) et constitue la cause la plus fréquente de morbidité et de mortalité (Sack et coll., 2001). *S. dysenteriae* type 1 ou bacille de Shiga est très répandu et évolue selon un mode épidémique, surtout dans les zones dont le niveau d'hygiène est précaire (Talukder et coll., 2006). Ainsi, des incidences 50 à 100 fois supérieures à celles des pays développés sont observées, avec des taux de mortalité atteignant 25%. L'épidémie africaine de dysenterie due à une souche multirésistante de *S. dysenteriae* 1 entraînant une mortalité élevée est préoccupante (Allen et coll., 1994 ; Frost et coll., 1985). Dans les pays développés, l'incidence est faible, d'environ 9 pour 100.000 habitants (USA). *S. sonnei* est l'espèce prédominante et évolue selon un mode épidémique (Kimura et coll. 2004). *S. flexneri* est beaucoup plus rare.

4.2- Manifestations cliniques et complications

Le processus pathologique est très rapide. La forme dysentérique aiguë typique de l'adulte débute brusquement, après une incubation brève. Elle se caractérise par des douleurs abdominales souvent accompagnées de vomissements, d'épreintes et de l'émission permanente de selles innombrables (jusqu'à 100 par 24h), glairo-sanglantes et purulentes, voire hémorragiques. La fièvre est élevée, avec altération de l'état général. Le malade guérit le plus souvent spontanément en quelques jours et plus rapidement après administration d'antibiotiques. Des complications à court terme peuvent cependant survenir, surtout chez le nourrisson et le jeune enfant : 1) le mégacolon toxique, 2) l'hypoglycémie, apanage des infections à *S. flexneri*, et qui serait liée à une inhibition de la néoglucogénèse, 3) les translocations bactériennes, observées dans 4 à 8% des cas, essentiellement au cours des infections sévères (Struelens et coll. 1985) et qui peuvent déclencher des septicémies voire des chocs septiques, 4) le syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui correspond à une microangiopathie résultant de lésions des petits vaisseaux et aboutissant à une anémie hémolytique et à une insuffisance rénale aiguë (Keusch et coll., 1989), et 5) des crises convulsives généralisées survenant à la faveur d'une hyperthermie majeure.

Des complications chroniques peuvent également survenir, dominées par un état prolongé de malnutrition avec retard staturo-pondéral sévère chez les jeunes enfants dont la cause n'en est pas clairement déterminée. La shigellose a récemment été reconnue comme l'une des premières causes de malnutrition dans les pays en voie de développement. Enfin, elle pourrait également entraîner des anomalies fonctionnelles digestives, en particulier un SII. En effet, le développement d'un SII au décours de shigellose a été rapporté dans 7 à 31% des cas, et dépendrait de la sévérité de l'atteinte initiale et de la durée de la diarrhée (Ji et coll., J Gastroenterol Hepatol 2005 ; Kim et coll., Korean 2006).

4.3- Traitement de la shigellose

En dehors de la correction de l'hyponatrémie, de l'hypoglycémie ou des crises convulsives, le traitement repose sur l'antibiothérapie qui permet généralement une guérison rapide et sans séquelles. Cependant, on note actuellement l'émergence de souches multirésistantes, particulièrement de *S. flexneri* et *S. dysenteriae* 1, qui compliquent le traitement. Ces espèces/sérotypes apparaissent fréquemment résistants à tous les antibiotiques dits de première ligne (Ampicilline, Tétracycline, Sulfaméthoxazole-Triméthoprine,

Chloramphenicol, Acide Nalidixique), et obligent à l'usage d'antibiotiques plus rares et bien plus chers (Fluoroquinolones et Céphalosporines de 3ème génération). À ce jour, les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine et la norfloxacine sont actives contre *Shigella*, mais des flambées dues à des souches de *S. dysenteriae* 1 résistantes à ces antibiotiques ont été observées au Bangladesh, en Asie et en Afrique (Niyogi et coll., 2007). Il est tout à fait justifié, compte tenu des connaissances sur les précédentes épidémies, de s'attendre ces prochaines années à de nouvelles épidémies de shigellose dues à la résistance de *S. dysenteriae* 1 aux fluoroquinolones, en particulier en Asie du Sud et vraisemblablement en Afrique. Enfin, comme pour toutes les maladies diarrhéiques, le traitement prophylactique repose sur l'amélioration des conditions d'hygiène et, à l'avenir, le développement d'un vaccin (von Seidlein et coll., 2006).

4.4- Lésions observées au cours de la shigellose humaine

Très peu de travaux sont disponibles chez l'homme, en grande partie en raison de la sous-médicalisation des zones d'endémie et de l'absence d'explorations complémentaires. Au Bangladesh, Raqib et coll. (1995) ont étudié en histologie standard et en immunohistochimie les biopsies rectales de patients atteints de shigellose. Ces auteurs ont montré une desquamation épithéliale importante associée à une diminution des récepteurs de diverses cytokines comme l'interféron gamma, le TNF-alpha, l'IL-1, l'IL6, l-IL-4 et le TGF-beta à la phase précoce de l'infection (entre le deuxième et le sixième jour). Cette diminution de l'expression pourrait s'expliquer par l'internalisation des récepteurs induite par les cytokines, la desquamation épithéliale. D'autres auteurs ont caractérisé les lésions tardives à partir de l'analyse autopsique de cas fatals de shigellose (Butler et coll., 1989) et montré que les lésions macroscopiques associaient un œdème muqueux, des érosions et des ulcérations profondes. Sur le plan microscopique, il existait un infiltrat inflammatoire de la lamina propria, des abcès cryptiques. En revanche, aucun travail chez l'homme n'a étudié les effets de *Shigella* au cours de temps très précoces (ie. à la phase asymptomatiques) de l'infection, ni sur les autres composantes extra-muqueuses de la paroi colique, en particulier le SNE.

4.5- Modèles animaux de shigellose

4.5.1- Modèles d'infection par les voies naturelles

Le modèle de singe macaque infecté par voie intragastrique (Sansonetti et coll., 1991) est probablement le modèle le plus proche de l'homme, car cet animal peut développer une shigellose sans recours préalable à une mise à jeûn ou une antibiothérapie. L'infection aboutit à des altérations histologiques similaires à celles observées chez l'homme avec un infiltrat inflammatoire important de la muqueuse, et une dégénérescence voire une disparition de l'épithélium (Yoshikawa et coll., 1995). Ce modèle a été utilisé jusqu'à présent essentiellement pour tenter de développer un vaccin contre la shigellose. Il comporte plusieurs limites : 1) une proportion importante de singes (jusqu'à 18%) peut développer une shigellose naturelle qui modifie leur immunité (Rout et Formal, 1975) ; ceci nécessite une sélection des animaux en amont des expérimentations, 2) la dose infectante doit être jusqu'à 100 millions de fois plus élevée que chez l'homme, et 3) enfin, ce modèle est très onéreux.

Le modèle de souriceau nouveau-né infecté par voie intragastrique (Fernandez et coll., 2003) est sensible à *Shigella* ; il est pertinent pour vérifier la virulence d'une souche. Cependant, son intérêt est limité par l'importance de la dose infectante (10^9 CFU), et par son utilisation restreinte aux 4 ou 5 premiers jours de la vie, c'est à dire avant la maturation du système immunitaire.

Le modèle de cobaye avec infection par voie rectale de Shim et coll. (2007) est probablement le plus intéressant. En effet, il est reproductible et possède des caractéristiques histologiques comparables aux biopsies rectales de patients atteints de shigellose. Ainsi, ces auteurs ont rapporté des signes inflammatoires dès la 6^{ème} heure, avec un épaissement pariétal, une destruction tissulaire de la muqueuse et de la sous-muqueuse, un infiltrat inflammatoire à partir de la 48^{ème} heure. Très peu de shigelles avaient envahi et colonisé l'épithélium entre la 2^{ème} et la 6^{ème} heure post-infection. A la 24^{ème} heure, les bactéries étaient situées dans la lamina propria et la sous-muqueuse, avant d'être éliminées à la 48^{ème} heure. (figure 17). Ce modèle nécessite une dose infectante importante (10^9 CFU) mais il ne requiert pas de traitement antibiotique préalable ni de jeûne pour induire l'infection.

4.5.2- Modèles d'infection par ligature

Ces modèles sont par définition très artificiels. Le modèle d'anse ligaturée de lapin est largement utilisé. Il consiste à ouvrir la cavité péritonéale sous anesthésie générale et à ligaturer des fragments d'intestin grêle d'environ 10 cm. La solution contenant le pathogène est ensuite injectée dans la lumière de l'anse intestinale. Le maintien de l'anse intestinale dans son milieu permet de mesurer différents paramètres de l'inflammation : la morphologie des villosités, la sécrétion de liquide, la production de cytokines et le recrutement de cellules inflammatoires. Ce modèle a notamment permis de démontrer que le blocage de la sécrétion d'IL-8 diminuait considérablement les dommages tissulaires intestinaux en limitant l'afflux de polynucléaires neutrophiles (Perdomo et coll., 1994). Il requiert cependant un jeûne préalable et une antibiothérapie pour favoriser le développement de l'infection.

Une variante intéressante (Rabbani et coll., 1995) consiste à réaliser un court-circuit du caecum par ligature, afin d'éviter la protection par la flore caecale, et à instiller directement les bactéries dans le colon droit. A la différence du modèle de lapin initial, ce modèle reproduit la réponse inflammatoire et les signes histologiques de la shigellose humaine, sans nécessité de jeûne ou d'immunodépression de l'animal.

4.5.3- Autres modèles

En 1962, Voino-Yasenetsky et coll. ont proposé un modèle d'infection pulmonaire chez la souris par inoculation intranasale de *Shigella* (Voino-Yasenetsky et coll., 1962). Ce modèle a été utilisé pour déterminer l'atténuation de la virulence, tester expérimentalement l'immunisation, et déterminer la protection contre l'infection. Cependant, l'absence de pertinence clinique par rapport au site d'infection constitue une limite majeure.

Le modèle de xénotransplantation souris-homme (SCID) développé par Seydel et coll. (1997) constitue une approche intéressante, notamment pour évaluer à différents temps les effets de l'infection par *Shigella*. Ainsi, Zhang et coll. (2001) ont montré sur les fragments intestinaux humains qu'une inflammation sévère et des dommages muqueux étaient décelables dès la 4^{ème} heure post-infection, et une destruction complète muqueuse à partir de la 8^{ème} heure. Ces constatations étaient associées à une production intestinale humaine importante d'IL-8, d'IL1- β et à un afflux massif de polynucléaires neutrophiles. Cependant, ce modèle très artificiel, qui implique une immunodépression, est peu reproductible car difficile à manier du fait de sa complexité.

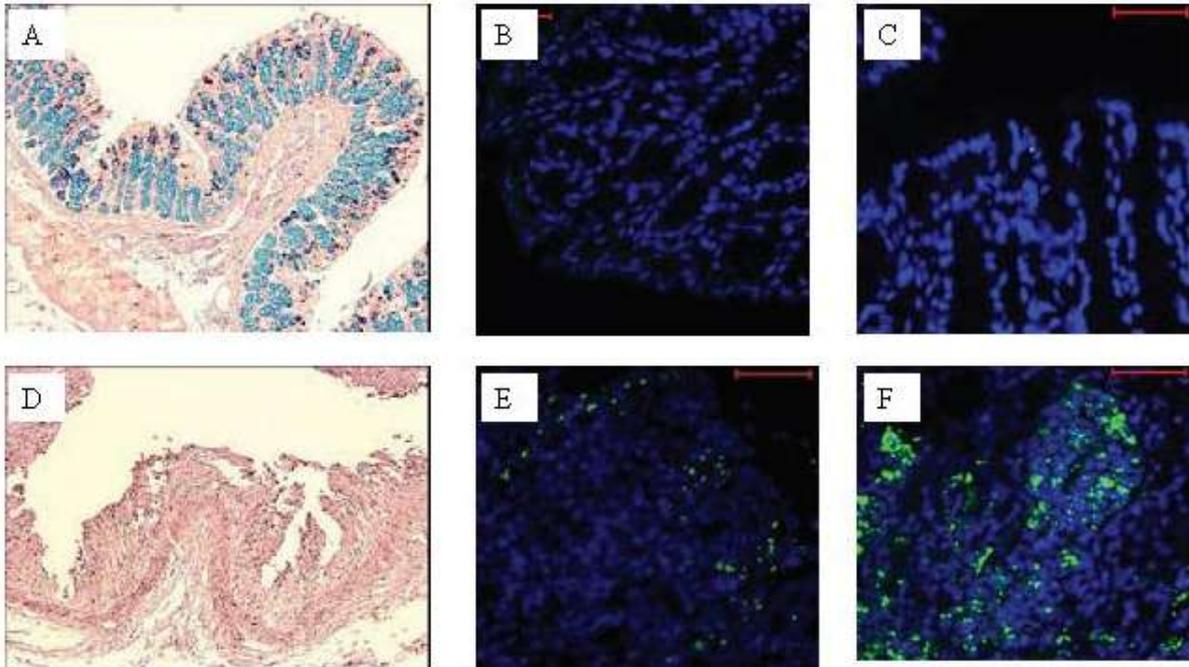


Figure 17 : Modèle de shigellose chez le cobaye

A la 48^{ème} heure post-infection, le marquage H&E montre une histologie normale chez les animaux non-infectés vs. des érosions muqueuses voire une destruction muqueuse majeure associée à un infiltrat inflammatoire important chez les animaux infectés (A vs. D). De plus, le marquage immunohistochimique par anticorps dirigé contre *Shigella* (en vert) et DAPI (en bleu) montre l'absence d'invasion bactérienne chez les animaux non-infectés vs. une invasion rapide par *Shigella* chez les animaux infectés à 12h (B vs. D) et 24h (E vs. F).

(d'après Shim et coll., 2007)

4.6- Physiopathologie de l'infection par *Shigella flexneri*

Les modèles cellulaires ont largement été utilisés pour comprendre les mécanismes cellulaires d'infection de *S. flexneri* notamment dans les cellules de la BEI. Les modèles cellulaires comportent soit des lignées humaines peu différenciées et non polarisées comme HeLa et Hep-2 cultivées en flacons, soit des lignées cultivées de manière plus sophistiquée, comme Caco-2 ou T84, sur des filtres permettant de générer des cellules polarisées avec des membranes apicales et basolatérales et des jonctions serrées, voire une véritable bordure en brosse intestinale (Philpott et coll, 2000). Ces modèles ont permis d'importantes avancées, en particulier dans la compréhension des mécanismes moléculaires développés par *Shigella* pour prendre le contrôle des cellules hôtes. Trois phases d'invasion successives peuvent être décrites: 1) franchissement par *Shigella* de la BEI et infection des macrophages sous-jacents, 2) invasion de la cellule épithéliale et 3) propagation de l'infection de cellule à cellule.

4.6.1- Franchissement de la BEI et infection des macrophages

Shigella franchit la BEI en utilisant deux voies possibles : la voie directe lorsque les bactéries s'attaquent directement à l'épithélium (Sansonetti, 2004), et le parcours 'assisté' impliquant les cellules M. Pouvant difficilement infecter les cellules épithéliales par leur pôle apical, *Shigella* infecte les cellules M avant d'envahir la muqueuse colique au niveau de l'épithélium (Sansonetti et coll., 2001). En effet, contrairement aux entérocytes, les cellules M sont dépourvues de mucus, de glycocalyx et de microvillosités et elles sont donc accessibles aux pathogènes endoluminaux. De plus, elles possèdent une activité phagocytaire leur permettant 'd'échantillonner' les antigènes présents dans la lumière intestinale afin de les présenter aux macrophages situés dans la muqueuse. *Shigella* infecte ensuite les macrophages dont elle induit la mort par apoptose et la libération d'IL-1 β , après son activation par caspase-1 (Zychlinski et coll., 1994). Cette mort du macrophage démarre ainsi un processus inflammatoire qui aboutit à un afflux massif de polynucléaires, et entraîne la destruction de la BEI et l'invasion massive de nouvelles bactéries à partir des lésions tissulaires (Perdomo et coll., 1994) (figure 18).

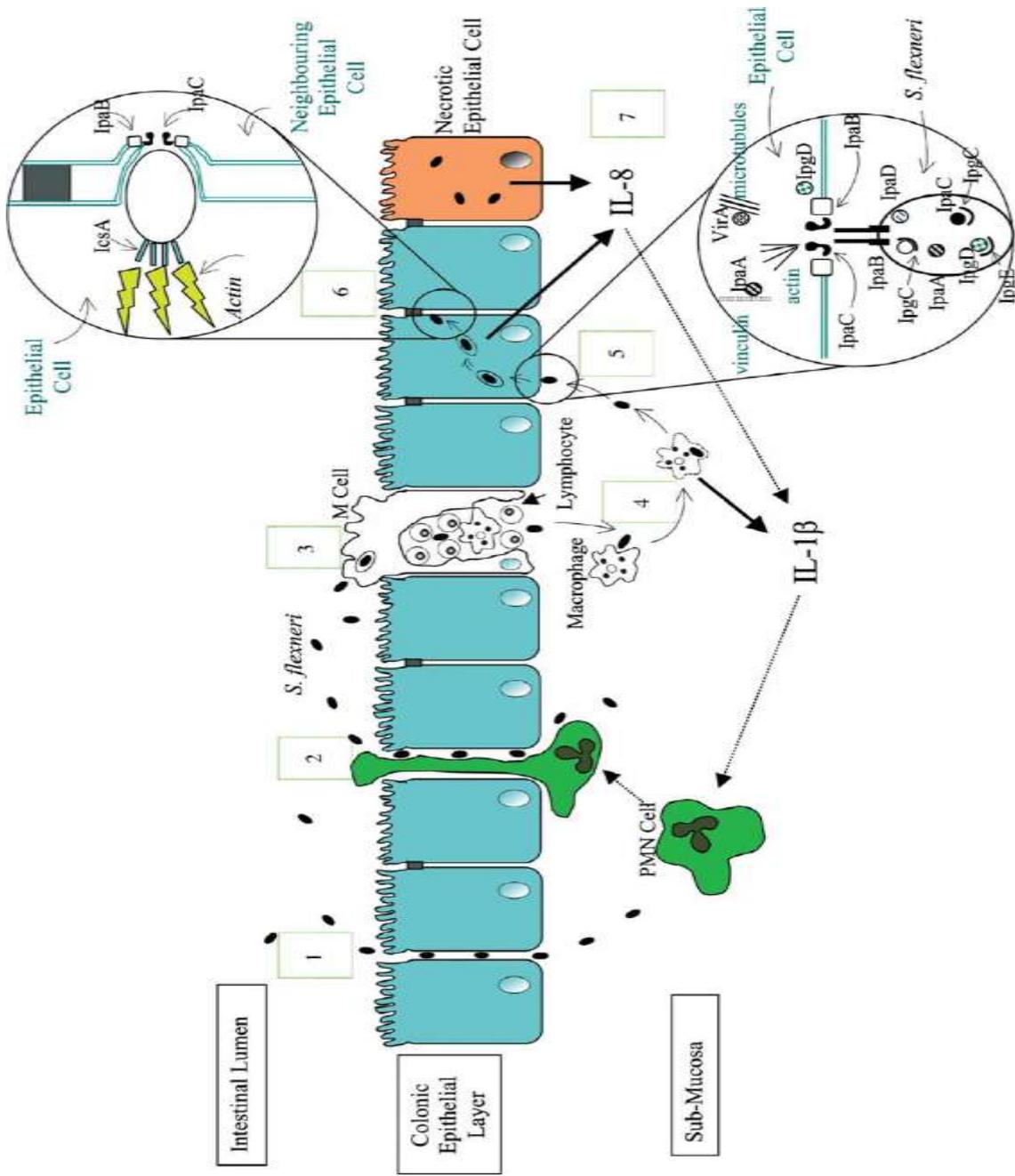


Figure 18 : Schéma physiopathologique de l'infection par *Shigella flexneri* I (d'après Sansonetti et coll., 2001)

4.6.2- Invasion de la cellule épithéliale

Après la phase précédente lui permettant de rentrer en contact direct avec les cellules épithéliales, cette phase est caractérisée par une véritable ‘prise de commandes’ de la cellule épithéliale par *Shigella* grâce à son appareil de sécrétion de type III.

4.6.2.1- L'appareil de sécrétion de type III

Sur le plan moléculaire, il a été démontré dès le début des années 1980 que le pouvoir invasif de *Shigella flexneri* était codé par un grand plasmide de virulence, d'environ 220 kb (Sansonetti et coll., 1980,1981,1982). Ce plasmide de virulence contient un îlot de pathogénicité de 30 kb codant pour un appareil de sécrétion de type III (TTSS). Véritable aiguille moléculaire, le TTSS permet l'injection de protéines de la bactérie, encore extracellulaire, dans le cytosol cellulaire (Hueck, 1998) soit pour induire l'internalisation de la bactérie par les cellules épithéliales, soit pour neutraliser l'action des phagocytes professionnels. L'appareil de sécrétion de type III de *Shigella* a été visualisé par microscopie électronique et sa structure caractérisée. Il se présente sous la forme d'un appareil composé de deux paires de plateaux reliés par une région tubulaire vraisemblablement périplasmique, ainsi que d'une aiguille exposée à la surface de la bactérie, pouvant atteindre plusieurs dizaines de nanomètres de longueur. L'acheminement de protéines bactériennes vers le cytosol cellulaire pourrait se faire par l'intermédiaire d'un pore membranaire, constitué vraisemblablement des premières protéines bactériennes exportées et assemblées dans la membrane de la cellule hôte. Ce pore a une taille estimée à 3 nm environ et contient notamment les protéines IpaB et IpaC (Blocker et coll., 1999).

4.6.2.2- Les effecteurs bactériens

On dénombre environ 25 effecteurs pour *S. flexneri* (Buchrieser et coll., 2000), dont certains interviennent sur l'organisation du cytosquelette d'actine, ce qui conduit à l'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales (Tran Van Nhieu et coll., 2000). Les effecteurs bactériens sont associés à des protéines chaperonnes qui évitent leur dégradation protéolytique dans le cytoplasme de la cellule cible. Ainsi, IpgC se lie à IpaB et IpaC, deux facteurs de virulence essentiels de *Shigella*, afin d'empêcher leur dégradation (Lunelli et coll., 2009). D'autres, de découverte plus récente, ont une action anti-

inflammatoire comme OspG qui inhibe l'ubiquitinylation de IκBα et empêche l'activation de NF-κB (Kim et coll., 2005).

Les protéines sécrétées par *Shigella* ont été caractérisées comme ayant différents rôles dans l'invasion des cellules. Ainsi, La protéine IpaC participe à la formation du pore inséré au contact de la cellule par l'appareil de sécrétion et induit la polymérisation de l'actine (Tran Van Nhieu et coll., 2000). Le mécanisme par lequel cette protéine agit implique l'activation des GTPases Cdc42, Rac et Rho. Cdc42 et Rac permettent la polymérisation d'actine alors que Rho intervient plus spécifiquement dans le recrutement de composés nécessaires à la transformation des extensions filopodiales en structure permettant l'internalisation de la bactérie (Tran Van Nhieu et coll., 2000). Par ailleurs, la tyrosine kinase Src, qui est activée durant l'entrée de *Shigella*, pourrait jouer un rôle de coordinateur de l'activité des différentes GTPases. En effet, l'activité kinase de Src, combinée à l'action de Cdc42 et Rac, est requise pour le développement des foyers de polymérisation d'actine au site d'entrée de *Shigella*.

La protéine IpaA permet l'organisation des filaments d'actines polymérisée en structure propice à l'internalisation de *Shigella*, en agissant à différents niveaux. Il a aussi été démontré qu'IpaA se lie directement à la vinculine, protéine qui permet l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Bourdet-Sicard et coll., 1999). La fixation d'IpaA à la vinculine conduit au dépliement de celle-ci et active l'association du complexe IpaA-vinculine aux filaments d'actine. Cette activation interviendrait dans la formation d'une structure d'adhérence transitoire de la bactérie à la membrane de la cellule.

Des protéines, autres que celles citées précédemment, sécrétées par *Shigella* pourraient être impliquées dans l'invasion et la destruction de l'épithélium intestinal. C'est le cas de SepA, dont le gène est porté par un plasmide de virulence de *Shigella* qui code pour une protéine précurseur de 150 kDa. Une fois sécrétée, la protéine est clivée et convertie en une forme mature de 110 kDa. La construction d'un modèle de *Shigella* muté pour SepA a démontré que cette protéine n'était pas indispensable à l'invasion ou à la dissémination de la bactérie dans l'épithélium intestinal (Benjelloun-Touimi et coll., 1995). Toutefois, dans un modèle d'anses intestinales de lapin infecté par *Shigella* –SepA muté, l'atténuation de l'invasion de la bactérie au sein de l'épithélium, suggère son rôle potentiel dans l'invasion tissulaire. (Benjelloun-Touimi et coll., 1995).

Des travaux très récents ont montré que *Shigella* était également capable de prévenir la desquamation épithéliale, afin d'empêcher l'hôte de se débarrasser du pathogène. En effet, Kim et coll. (2009) ont montré que OspE (constitué des protéines OspE1 et OspE2), sécrété par *Shigella*, renforce l'adhérence des cellules à la membrane basale, notamment en augmentant

l'expression de l'intégrine 1. Une autre manière de moduler la réponse inflammatoire de l'hôte est l'injection d'OspG par le TTSS. Cette protéine codée par le plasmide de virulence permet de bloquer l'inflammation en dégradant le facteur I-kB (Kim et coll., 2005) et bloque donc la signalisation de NF-kB.

4.6.2.3- Induction de la phagocytose

Les effecteurs bactériens permettent ensuite à *Shigella* de remodeler le cytosquelette cellulaire afin d'induire son entrée dans des cellules naturellement non-phagocytaires (Clerc et coll., 1987). En effet, ces effecteurs induisent la formation d'extensions cellulaires au voisinage du site d'interaction bactérie-cellule. Il a récemment été montré que ces extensions sont dues à une polymérisation de l'actine dépendant de Src *via* IpaC (Mounier et coll, 2009). Ces extensions fines, appelées filopodes, s'allongent de plusieurs micromètres en l'espace de quelques minutes, puis se transforment rapidement en feuilletts membranaires, qui s'élèvent au dessus du corps bactérien et fusionnent pour conduire à l'internalisation de la bactérie dans une large vacuole de phagocytose. Ces remaniements de la surface cellulaire sont induits par la capacité de *Shigella* de réorganiser de manière transitoire le cytosquelette cortical, en contrôlant localement la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine, ainsi que leur organisation (figure 19).

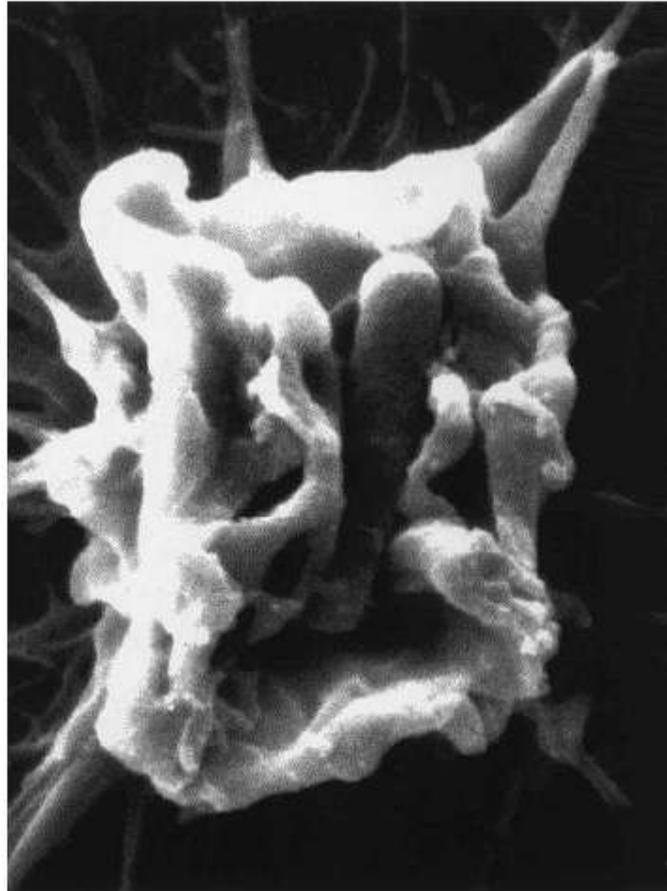


Figure 19 : Photographie en microscopie électronique montrant l'internalisation de *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) par une cellule épithéliale. Les protrusions membranaires conduisant à l'internalisation sont induites par *S. flexneri* à la surface de la cellule épithéliale. Une fois internalisée, *Shigella* lyse sa vacuole de phagocytose et se multiplie librement dans le cytoplasme (d'après Philpott et coll., 2000).

4.6.3- Propagation de l'infection de cellule à cellule

Une fois entrée dans la cellule, *Shigella* peut se mouvoir à des vitesses atteignant 10µm par minute. Cette mobilité intracellulaire permet à la bactérie d'atteindre la membrane plasmique, où elle induit la formation de protrusions qui peuvent s'invaginer dans des cellules adjacentes (figure 20). Ces protrusions engendrent des vacuoles à deux membranes qui sont ensuite lysées, permettant l'accès de la bactérie au cytosol de la cellule adjacente et donc le passage de cellule à cellule. La mobilité de *Shigella* se fait par polymérisation de l'actine (Carlier et coll., 1999) ; en effet, la protéine bactérienne nécessaire et suffisante à la mobilité de *Shigella* au sein de la cellule est IcsA/VirG, une protéine de membrane externe de 1102 acides aminés. La caractéristique majeure de cette protéine est la présence de répétitions riches en glycine dans sa première partie. Cette protéine est distribuée de manière polaire à la surface de la bactérie. Quand on exprime IcsA chez E.Coli K12, les bactéries forment des comètes similaires à celles de *Shigella* dans des extraits acellulaires. IcsA recrute une protéine cellulaire N-WASP, qui a la capacité de recruter le complexe Arp2/3. Ce complexe devient alors très actif, c'est-à-dire qu'il est capable de catalyser l'étape limitante de nucléation dans le phénomène de polymérisation de l'actine (Egile et coll., 1999).

Un autre élément favorise la dissémination de *Shigella* de cellule à cellule. Il s'agit des jonctions intercellulaires communicantes GAP, constituées de protéines transmembranaires comme les connexines. Les jonctions GAP s'oligomérisent pour former un hémicanal ou connexon. Lorsque ces structures rentrent en contact avec un connexon présent dans une cellule adjacente, elles forment un canal ouvert au travers duquel diffusent des seconds messagers comme l'AMPc, le calcium ou l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) impliqué dans le relargage du Ca²⁺ stocké dans le réticulum endoplasmique. Il a été montré récemment que *Shigella* a une dissémination accrue dans les cellules HeLa, qui expriment de façon stable la connexine 26 (Tran Van Hieu et coll., 2003).



Figure 20 : Photographie de microscopie électronique montrant la propagation de *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) de cellule à cellule. Lors de cette phase de réplication, elle se déplace de manière intracellulaire grâce à l'assemblage et à la dépolymérisation de l'actine. L'accumulation d'actine propulsant *Shigella* est visible derrière la bactérie. (d'après Philpott et coll., 2000).

4.7- Conclusion et conséquences

Si tous les modèles cellulaires ou animaux précédemment décrits ont permis des avancées majeures et significatives sur la compréhension des mécanismes moléculaires d'invasion par *Shigella*, aucun ne reproduit les conditions de la shigellose humaine de façon satisfaisante. En effet, plusieurs biais existent : 1) les modèles cellulaires sont issus de lignées épithéliales tumorales dans lesquelles sont intervenues des modifications génétiques, ou de procédés d'immortalisation au cours desquelles elles perdent certaines caractéristiques du tissu dont elles dérivent, dont la forme et la distribution des antigènes de surface, 2) la dose infectante est beaucoup plus faible chez l'homme que dans les modèles animaux. Par exemple, chez le singe macaque la dose infectante est 10 millions à 100 millions de fois supérieure à celle de l'homme, 3) les variations interespèces, notamment en terme de microflore autochtone, sont susceptibles de modifier considérablement le type d'inflammation et les mécanismes moléculaires impliqués dans la survenue de la shigellose, 4) le type d'atteinte varie considérablement en fonction du site d'infection dans les modèles animaux. Enfin, aucune étude n'est disponible concernant les interactions entre *Shigella* et le SNE.

Le but de notre travail a donc été d'étudier les interactions précoces entre *S. flexneri* et les différentes composantes de la paroi colique humaine dans un modèle organotypique, ainsi que les mécanismes impliqués.

**- CONTRIBUTION A L'ETUDE DU
SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE
HUMAIN NORMAL ET PATHOLOGIQUE -**

Comme on l'a vu dans la revue générale précédente l'étude du SNE chez l'homme demeure difficile et le nombre de données réellement pertinentes sur un plan physiopathologique est limité. Le programme de recherche que nous avons développé au sein de l'U913 et du service d'Hépatogastroentérologie de l'IMAD s'inscrit délibérément dans une optique de recherche translationnelle. Ce programme impliquait deux objectifs qui ont été suivis conjointement, même si la date de parution des travaux ne reflète pas toujours l'ordre chronologique de leur réalisation. Ainsi nous avons souhaité, en temps que gastroentérologue spécialisé en endoscopie, utiliser le matériel biopsique obtenu lors de coloscopies standard pour des études du laboratoire portant sur la caractérisation du SNE tant du point de vue morphologique que fonctionnel. Parallèlement nous avons utilisé, toujours à partir de tissus humains, les techniques du laboratoire pour explorer certaines pathologies 'types' de nature dégénérative (la maladie de Parkinson) ou inflammatoire (la shigellose prise comme modèle).

▪ Utilisation de biopsies coliques pour l'étude du SNE humain

Même si des travaux antérieurs ont utilisé des pinces à biopsie chirurgicales pour l'étude des plexus muqueux, l'approche choisie restait très invasive (Schneider et coll., 2001). De plus cette méthode était limitée à l'exploration de l'innervation du rectosigmoïde. Notre approche a consisté à utiliser des biopsies coliques standards chez des patients nécessitant une exploration endoscopique.

Pour mener à bien cette étude de preuve de concept, nous avons réalisé des biopsies coliques sigmoïdiennes chez 3 patients ayant une coloscopie de dépistage après obtention de leur consentement éclairé. Six biopsies étaient réalisées, par un seul endoscopiste, à l'aide d'une pince à biopsie standard (FB220U, Olympus Co, Japon). Deux biopsies étaient immergées dans du sérum physiologique à + 4°C, pendant moins de 1 heure, avant d'être disséquées. Les 4 autres biopsies étaient conservées dans l'azote liquide pour analyse ultérieure en Western Blot. Dans un premier temps, nous avons décrit la méthode d'étirement et de dissection des biopsies permettant l'obtention de 'whole-mounts' pour réaliser une analyse immunohistochimique bidimensionnelle du plexus sous-muqueux. Décrire la méthode ; La taille moyenne de ces 'whole-mounts' était de $9,7 \pm 2 \text{ mm}^2$. Dans un second temps, nous avons évalué la densité ganglionnaire et neuronale au sein de ces whole-mounts. Chaque biopsie contenait en moyenne $3,4 \pm 0,95$ ganglions par mm^2 et chaque ganglion contenait $4,4 \pm 0,6$ neurones, soit environ 150 neurones par biopsie. Les réseaux interganglionnaires ainsi que les neurones isolés étaient clairement identifiables au sein des préparations grâce à l'immunomarquage par le NF200. Dans un troisième temps, nous avons étudié la faisabilité de détection des protéines neuronales et gliales à partir des biopsies. Chaque biopsie contenait en moyenne $435 \pm 153 \mu\text{g}$ de protéines. L'analyse en Western Blot permettait de montrer la présence de protéines neuronales PGP9.5 et gliales S100 β et GFAP. Ce travail a été publié dans *Neurogastroenterology and Motility* (2009).

Dans un travail collaboratif (Etude Entéropark) entre l'IMAD et le service de Neurologie du CHU de Nantes, nous avons également pu caractériser le phénotype neuronal au cours de la maladie de Parkinson (MP). La MP est la 2^{ème} maladie neurodégénérative avec une prévalence estimée à 1,6% pour les personnes de plus de 65 ans en France. Elle se caractérise par une triade associant un tremblement de repos, une akinésie, et des troubles du tonus musculaire. Ces troubles sont la conséquence de lésions neurodégénératives dans la

substance noire, qui sont caractérisées par la présence de corps de Lewy constitués en particulier d'agrégats d' α -synucléine. D'autre part, des études récentes montrent que le tube digestif est aussi impliqué dans la physiopathologie, voire l'étiologie de la MP. En effet, 80% patients développent des troubles digestifs et en particulier une constipation. Par ailleurs, des études plus récentes suggèrent que les lésions au cours de la MP pourraient débiter dans le SNE avant de se propager de manière centripète vers différentes structures du SNC, selon un schéma proposé par Braak et coll. (2007). Aussi, la capacité de détecter des lésions du SNE au cours de la MP et du vivant du patient pourrait permettre à la fois une détection précoce et aussi mieux comprendre les troubles digestifs.

Dans ce contexte, une étude (Entéropark) a été mise en place afin de caractériser les lésions éventuelles du plexus sous-muqueux chez les patients atteints de MP. Nous avons caractérisé les lésions du plexus sous-muqueux chez 5 patients atteints de MP explorés par coloscopie pour constipation, comparativement à 5 sujets sains (contrôles) explorés pour dépistage de cancer colorectal et à 3 patients explorés pour constipation chronique. Dans cette étude, il n'y avait pas de différence dans le nombre total de neurones ou la proportion de neurones dopaminergiques entre les patients atteints de MP et les contrôles, ni entre les contrôles et les patients ayant une constipation chronique. Néanmoins, dans 80% des biopsies de Parkinson, la présence de fibres immunoréactives pour l' α -synucléine (α -synucléine-IR) était détectée, alors qu'aucune fibre α -synucléine-IR n'était décelable chez les contrôles ou les patients explorés pour constipation. Ces données pilotes ont été publiées dans Gut (2008). En l'état actuel, l'étude Entéropark a inclus 27 patients atteints de MP et 9 témoins. Les résultats préliminaires montrent une prévalence de 78% de biopsies positives pour la présence de fibres α -synucléine-IR vs 0% chez les témoins, ainsi qu'une corrélation de la présence de ces fibres avec l'existence des symptômes de Parkinson (données non publiées).

En conclusion, nos travaux ont mis en évidence la faisabilité de la caractérisation morphologique et fonctionnelle du SNE à partir de biopsies coliques standard. De façon intéressante, la sensibilité semble suffisante pour détecter des lésions du SNE évocatrices de MP. Compte-tenu du caractère peu invasif des biopsies coliques, qui peuvent être réalisées au cours d'une endoscopie standard, cette approche pourrait constituer un outil séduisant pour l'étude de lésions précoces au cours de la MP afin de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques, et identifier de nouveaux biomarqueurs. Finalement, la mise au point de cette technique nous a permis, conjointement avec d'autres méthodes déjà disponibles dans l'U913, d'aborder l'étude du SNE en situation physiologique et inflammatoire aiguë.

2- Lésions muqueuses et neuronales précoces observées dans le colon humain au cours de l'infection par *Shigella flexneri*

Bien que la physiopathologie de l'infection par *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) ait été largement étudiée dans des modèles animaux et cellulaires permettant ainsi de caractériser les grands mécanismes impliqués, peu de données chez l'homme sont disponibles. En particulier, il reste à démontrer que les facteurs de virulence de *S. flexneri* identifiés chez l'animal puissent aussi participer aux processus pathologiques chez l'homme. Ainsi, la capacité de la sérine protéase Sep A à induire des lésions de la barrière chez l'homme semblables à celles observées *in vivo* chez l'animal reste à démontrer. Par ailleurs, bien que les effets de *S. flexneri* sur la BEI et le système immunitaire aient été largement décrits, leur impact sur le SNE reste à ce jour inconnu. Même si le SNE n'est probablement pas directement impliqué dans les phases aiguës de la shigellose, son rôle potentiel dans les troubles digestifs post-infectieux est suggéré par analogie avec les syndromes de l'intestin irritable (SII) post-infectieux observés dans 7 à 31% des cas (Ji et coll., J Gastroenterol Hepatol 2005 ; Kim et coll., Korean 2006). Aussi, les buts de notre étude étaient : 1) de caractériser les effets précoces de *S. flexneri* sur la muqueuse colique humaine, 2) d'identifier les facteurs bactériens impliqués dans ces effets, et en particulier de caractériser le rôle de SepA, et 3) d'étudier les effets éventuels de *S. flexneri* sur le SNE dans ce modèle colique humain.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle de culture organotypique de colon humain permettant l'étude *ex vivo* des interactions précoces entre l'hôte et des pathogènes. Un fragment colique humain prélevé à distance d'une tumeur colique au décours immédiat d'une intervention chirurgicale était disséqué afin d'obtenir une préparation contenant la muqueuse et la sous-muqueuse mais exempte de musculature. Ce spécimen était alors étendu et fixé dans une boîte de Petri recouverte de Sylgard et mis en culture pendant 3 heures en présence ou non des différentes souches de *S. flexneri*. A la fin de l'infection, le surnageant était collecté et conservé à -80°C . Le tissu était ensuite traité de façon adéquate pour réaliser des études morphologiques, immunohistochimiques, de microscopie électronique ou de dosage protéique.

En utilisant ce modèle, nous avons caractérisé dans un deuxième temps les effets précoces de *S. flexneri* sur la muqueuse colique. Après trois heures de culture, les tissus non infectés possédaient des caractéristiques morphologiques normales avec une muqueuse recouverte par un épithélium de surface et des cryptes intègres. Cet aspect morphologique

était préservé après infection avec une souche de *S. flexneri* non invasive, ie. BS176 qui est dépourvue de son plasmide de virulence. En revanche, après trois heures d'infection avec la souche sauvage de Shigella M90T, on observait en microscopie optique une desquamation majeure de l'épithélium de surface (>50% de la surface épithéliale) et une diminution de la hauteur de l'épithélium de surface. Des études en microscopie électronique ont confirmé ces résultats. Elles ont aussi permis de révéler l'absence de *S. flexneri* dans les cellules épithéliales et leur présence à proximité immédiate voire dans des granulocytes. En revanche des foyers bactériens denses étaient observés directement sous l'épithélium de surface en cours de desquamation. Enfin, de manière surprenante, la sécrétion d'IL-8 dans le milieu de culture était significativement réduite après infection par *S. flexneri* sauvage par rapport à la condition témoin.

Dans une troisième partie nous avons caractérisé l'impact de *S. flexneri* sur les propriétés morphologiques et le phénotype neurochimique du SNE. Par des études en microscopie électronique et optique nous avons montré que la souche invasive, mais pas la souche non invasive, induisait des altérations caractéristiques de processus dégénératifs à la fois dans les neurones mais aussi dans les cellules gliales entériques. Concernant les neurones, ces lésions se présentaient sous la forme de rétraction/contraction cellulaire, renflement axonal, altération de la chromatine dans le noyau et de noyaux picnotiques pour les cellules gliales. En outre, par méthode immunohistochimique, nous avons mis en évidence à la fois une diminution de la surface cytoplasmique et de l'intensité du marquage en neuron-specific enolase (NSE) des neurones après infection des tissus avec la souche invasive. De manière intéressante, nous avons montré que ces dernières modifications induites par *S. flexneri* étaient bloquées en présence d'un antagoniste des récepteurs NMDA, récepteurs métabotrope au glutamate. De plus, nous avons montré que *S. flexneri* induisait une augmentation de la proportion de neurones sous-muqueux immunoréactifs pour le VIP (VIP-IR). Néanmoins, cette augmentation de la proportion de neurones immunoréactifs n'était pas associée à une augmentation de la quantité de VIP totale mesuré par Elisa. Enfin, cet effet de *S. flexneri* sur la proportion de neurones VIP-IR n'était pas bloqué par le MK-801.

Deux conclusions principales découlent de cette étude. D'une part nos travaux ont permis de montrer que ce modèle reproduit certains effets caractéristiques des lésions coliques induites par *S. flexneri* chez les patients atteints de shigellose. En outre, ce modèle présente l'avantage de pouvoir s'affranchir de la composante inflammatoire associée au recrutement par voie sanguine, et de pouvoir moduler pharmacologiquement le modèle pour en préciser les mécanismes physiopathologiques. En particulier, nous avons pu montrer chez l'homme

que SepA jouait un rôle nécessaire mais non suffisant pour induire les lésions de *S. flexneri* ; elle renforce ainsi le rôle des protéases dans les processus de lésions de la BEI. Concernant le SNE, notre étude a permis de montrer que *S. flexneri* induit des lésions du SNE qui pourraient participer au développement de processus post-infectieux observés après certaines shigelloses tels que le SII. En outre, nous avons montré que *S. flexneri* induit des processus neurodégénératifs chez l'homme et nous avons ainsi pu poser les bases d'études pharmacologiques visant à étudier ou prévenir les processus neurodégénératifs du SNE. Dans ce contexte, nos travaux suggèrent aussi le rôle clef joué par le glutamate, via l'activation de récepteurs au NMDA, et des processus excitotoxiques associés.

Ces travaux ont été publiés dans PlosOne (2009).

- DISCUSSION GENERALE -

Ce travail de thèse s'inscrit dans un axe de la Neurogastroentérologie encore peu développé. En effet, les travaux réalisés au cours de ces trente dernières années se sont principalement concentrés sur la régulation physiologique par le SNE de fonctions digestives telles que la motricité et/ou le maintien de l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale (BEI). Ces progrès ont été réalisés en combinant principalement des méthodes d'électrophysiologie et d'immunohistochimie. En revanche l'impact du SNE dans les pathologies humaines reste mal connu. C'est dans ce contexte général que notre travail de thèse s'est organisé selon deux axes principaux : d'une part, le développement d'outils permettant d'étudier le SNE au cours de pathologies digestives et extra-digestives chez l'homme et, d'autre part, le développement d'un modèle d'étude de lésions du SNE au cours de processus inflammatoires.

Dans un premier temps nos travaux ont permis de développer et de valider une nouvelle méthode d'étude du SNE chez l'homme. Celle-ci est basée sur l'analyse de biopsies coliques à l'aide de pinces endoscopiques souples. Il s'agit d'une méthode peu invasive, facilement utilisable en routine clinique pour le diagnostic et l'étude des neuropathies entériques. Elle permet non seulement une analyse morphologique bi-dimensionnelle du SNE par immunomarquage, mais aussi la recherche et l'analyse de protéines neuronales et gliales par Western blot ou éventuellement par spectrométrie de masse. Une découverte surprenante était la forte rentabilité par biopsie de notre méthode en terme de nombre de ganglions et de neurones décelables en immunomarquage. L'analyse du plexus sous-muqueux en immunomarquage permet également d'évaluer l'intensité de la neuron-specific enolase (NSE), marqueur qui reflète la 'viabilité' neuronale, ainsi que le contenu en neuromédiateurs qui est susceptible d'être modifié lors des phénomènes de plasticité neuronale. Notre méthode combine donc plusieurs avantages, dont la facilité d'accès au plexus sous-muqueux colique, la bonne acceptabilité des biopsies auprès des patients, la possibilité de reproduire l'analyse au fil du temps pour une pathologie et un patient donné. Elle permet de caractériser le SNE au cours de pathologies comme la maladie de Parkinson.

Néanmoins, les limites de notre méthode sont les suivantes : la première est la courbe d'apprentissage relativement longue des techniques de dissection des biopsies. Ce caractère contraignant contraste avec la simplicité de réalisation des biopsies lors de l'endoscopie, et pourrait ralentir la diffusion de cette méthode en dehors de centres ayant un fort intérêt en Neurogastroentérologie. En particulier, l'investissement humain nécessaire afin d'obtenir et d'analyser de façon fiable le plexus sous-muqueux à partir des biopsies coliques ne devrait pas être sous-estimé. Le développement de techniques d'aide à la dissection des plexus et au

comptage automatisé par ordinateur serait souhaitable. La deuxième est le faible taux de protéines neuronales par rapport au reste du tissu. Cependant, les techniques d'enrichissement par immunoprécipitation pourraient constituer un moyen de surmonter cette difficulté. La troisième difficulté consiste à transposer cette méthode à l'œsophage ou à l'estomac pour caractériser le plexus sous-muqueux. En effet, les ganglions sous-muqueux sont trop rares au niveau oesophagien et trop profonds au niveau gastrique pour pouvoir être captés par des biopsies standard. La quatrième limite est l'absence d'accès par ces méthodes au plexus myentérique, qui pourrait être plus pertinent pour l'étude de certaines neuropathies entériques.

Le développement actuel de techniques d'endoscopie interventionnelle dédiés à la réalisation de résections tissulaires plus profondes en limitant le risque de perforation pourrait contribuer à améliorer l'étude du plexus myentérique. A l'avenir, il sera nécessaire de développer, comme cela a été le cas pour l'étude de la BEI, des outils moléculaires plus performants pour l'étude du SNE et le diagnostic des neuropathies entériques. Une telle approche a déjà été envisagée par Sumiyama et coll. (2009) qui ont montré dans un modèle animal qu'il était possible de visualiser des neurones myentériques à partir de sondes fluorescentes appliquées *in vivo* et ciblant sélectivement soit le corps neuronal soit les terminaisons nerveuses. De plus, ils ont couplé ces techniques d'application de sondes neuronales à des techniques endoscopiques interventionnelles et diagnostiques permettant d'accéder à la sous-muqueuse pour y insérer un endoscope muni d'un microscope. Sous réserve de leur application à l'homme pour des raisons éthiques, ces nouvelles approches endoscopiques pourraient à l'avenir révolutionner le diagnostic des neuropathies entériques.

Dans un deuxième temps, nous avons mis au point un modèle organotypique de muqueuse colique humaine. Ce modèle s'est avéré pertinent non seulement pour l'étude du SNE, mais aussi pour l'étude des effets de *Shigella* à des temps très précoces. Concernant le SNE, nos travaux ont montré pour la première fois l'existence d'une dégénérescence neuronale au cours de l'infection par *Shigella*, ainsi que l'induction d'une plasticité du phénotype neurochimique neuronal. Si cette neurodégénérescence se confirmait *in vivo* et atteignait le plexus myentérique, ce phénomène pourrait être incriminé dans la survenue d'un mégacolon toxique qui complique environ 5% des shigelloses (Bhimma et coll., 1997). D'autre part, ces processus neurodégénératifs pourraient également être impliqués dans le syndrome de l'intestin irritable qui affecte environ 15% des patients après une shigellose (Kim et coll., 2006). Néanmoins, l'ampleur des phénomènes de neurodégénérescence pourrait être surestimée par notre modèle en raison de conditions différentes de celles observées au cours de la shigellose humaine ; en effet, la 'charge' bactérienne dans notre modèle est

probablement supérieure à la situation rencontrée en pathologie humaine car ce modèle comporte une dévascularisation empêchant de surcroît le recrutement des cellules inflammatoires dotées d'effets bactéricides. Enfin, l'absence de péristaltisme et de renouvellement du milieu de culture favorise la prolifération bactérienne.

A ce stade se pose aussi la question de la spécificité de la réponse du SNE au cours d'autres infections aiguës. Des données précédemment obtenues dans notre laboratoire sont en faveur de la spécificité de cette réponse vis-à-vis de *Shigella*. En effet, l'infection par la toxine B du *Clostridium difficile* (*C. difficile*) dans un modèle identique d'organotypie a révélé l'absence de processus neurodégénératif malgré une réponse inflammatoire importante. De plus, alors que la toxine B du *C. difficile* induisait c-fos dans les neurones entériques, cet effet n'était pas observé lors de l'infection par *Shigella* (Neunlist et coll., 2003).

Nous avons identifié indirectement un facteur causal potentiel ie. le glutamate qui induisait ce processus via une voie NMDA-dépendante. Ces résultats sont en accord avec les effets excitotoxiques connus du glutamate dans le SNE et le SNC (Greenwood et coll., 2007). En particulier, Kirchgessner et coll. (1997) ont montré que le glutamate induisait une mort rapide des neurones entériques. Dans ce contexte, les processus de dégénérescence des CGE induits par *Shigella* pourraient aussi potentialiser les effets excitotoxiques du glutamate ; en effet, les CGE sont supposées participer aux processus de détoxification du glutamate en le captant et en le transformant en glutamine. Néanmoins, la source de glutamate responsable de ces éventuels effets reste à déterminer. La mise au point de ce modèle de neurotoxicité permet d'envisager de tester la capacité d'agents neuroprotecteurs sur le SNE humain.

Enfin, l'observation a priori contradictoire, d'une part, d'une augmentation de la proportion de neurones immunoréactifs pour le VIP et, d'autre part, de la diminution de la concentration de VIP dans la sous-muqueuse pourrait être le reflet de la dégénérescence des fibres nerveuses. En effet, un tel résultat a été observé par Schulte-Bockholt et coll. (1995) qui ont rapporté une élévation de l'ARNm du VIP parallèlement à une diminution des fibres VIPergiques au cours de la rectocolite hémorragique. Une telle diminution des fibres VIPergiques est observée dans différents modèles animaux au cours de l'inflammation aiguë ; elle est suivie d'un retour à sa valeur d'origine quelques semaines après l'induction de l'état inflammatoire (Simpson et coll., 2008). Cette perte de VIP pourrait aussi conduire à une amplification des lésions induites par *Shigella* car le VIP augmente la résistance de la BEI (Neunlist et coll., 2003). Elle possède enfin des effets anti-inflammatoires importants (Abad et coll., 2003).

Un dernier aspect intéressant de notre modèle est sa capacité à étudier la shigellose humaine à une phase très précoce, à la fois dans le temps mais aussi du fait de l'absence de recrutement inflammatoire. Il permet ainsi d'étudier l'effet propre de *Shigella* sur la BEI. Notre étude suggère également que la présence de cellules M n'est pas indispensable à l'infection de la BEI par *Shigella*. En effet, même si *Shigella* peut interagir préférentiellement avec les cellules de l'épithélium folliculaire, cette interaction n'est pas nécessaire pour induire le processus infectieux dans notre modèle. Ces résultats sont aussi en accord avec notre observation du rôle joué par la sérine-protéase SepA dans le processus de desquamation. En effet, SepA est nécessaire pour induire les lésions de la muqueuse. Même si les mécanismes impliqués restent à élucider, SepA pourrait, comme d'autres protéases, induire une rupture de la BEI et de sa perméabilité et ainsi faciliter les processus invasifs de *Shigella*.

Notre modèle comporte plusieurs limites : 1) la dose infectante est probablement beaucoup plus élevée qu'au cours d'une shigellose, 2) il existe une hyperprolifération de SF dans le milieu du fait de l'absence d'expulsion de l'agent pathogène. Cette condition pourrait d'ailleurs être comparée à celle qui existe lors du mégacolon toxique. 3) La flore commensale est altérée, ce qui limite son rôle protecteur, 4) l'hypoxie inhérente à la dévascularisation du modèle est aussi probablement responsable d'une susceptibilité accrue du tissu à *Shigella* car l'état inflammatoire de base fragilise la BEI (données non publiées). En effet, un pré-traitement de cellules Caco-2 par TNF- α et interféron augmente l'invasion de la BEI par *Shigella*. Cette susceptibilité pourrait se manifester par une fragilisation épithéliale qui potentialise la virulence de *Shigella*. Ces limites contribuent à rendre notre modèle artificiel en comparaison de 'la vraie vie'. Néanmoins, il semble pertinent car il reproduit les lésions histologiques observées chez l'homme, et les modèles animaux les plus proches de l'homme comme le macaque, le cobaye et le modèle de lapin avec court-circuit caecal. Par rapport à ces modèles animaux, notre modèle organotypique présente cependant deux limites importantes. D'une part, il ne permet pas de caractériser la réponse inflammatoire, qui est limitée aux cellules résidentes en l'absence de recrutement inflammatoire. D'autre part, il ne peut être maintenu en culture plus de quelques heures, et il ne constitue donc pas un modèle adéquat pour l'étude à moyen et long terme des phénomènes de plasticité neuronale et de neurodégénérescence. Cette étude pourrait en revanche être menée chez l'animal.

En conclusion, nos travaux ont permis de développer une méthode d'étude du SNE utilisable en clinique dans les pathologies coliques humaines, et de démontrer le rôle de l'inflammation dans le développement précoce de neuropathies entériques. D'une part, ils ont montré la possibilité d'étudier le SNE en combinant des approches immunohistochimiques et

de Western blot du plexus sous-muqueux interne à partir de biopsies coliques obtenues au cours d'une coloscopie standard. D'autre part, l'approche organotypique a montré que *S. flexneri* induisait des altérations majeures et précoces de la BEI associées à une plasticité neuronale et des phénomènes de neurodégénérescence. Même si les résultats rapportés ici sont majoritairement descriptifs, nous avons également pu aborder divers aspects mécanistiques impliqués dans ces phénomènes. Ainsi, nous avons pu identifier le rôle-clé de la sérine protéase SepA dans la survenue des lésions de la BEI, et suggérer l'implication du L-NAME dans la plasticité neuronale ainsi que celle du glutamate dans les phénomènes de neurodégénérescence.

Les perspectives qui découlent de ces travaux sont multiples. D'une part, l'utilisation de biopsies digestives ouvre des perspectives à la fois sur le plan pronostique et thérapeutique. Par exemple, leur caractère non ou peu invasif permet de les répéter chez un patient donné, éventuellement en fonction du traitement, afin de suivre l'évolution ou la régression d'une pathologie impliquant le SNE et elles pourraient ainsi aider à mieux évaluer le pronostic d'un patient. Sur le plan thérapeutique, une avancée spectaculaire récente a été rapportée par Metzger et coll. (2009), qui ont montré que les biopsies digestives permettaient de cultiver des cellules souches neuronales (CSN) afin de recoloniser des explants tissulaires de patients ayant une maladie de Hirschprung. Si elle était confirmée, la possibilité de réaliser une véritable transplantation de neurones entériques à partir de biopsies muqueuses pourrait également transformer le pronostic de patients ayant des altérations sévères du SNE. Dans ce cas l'analyse préalable par les biopsies muqueuses pourrait orienter les indications thérapeutiques. D'autre part, ce travail valorise aussi notre modèle organotypique comme outil d'évaluation d'autres agents pathogènes induisant des lésions de la BEI, et de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans diverses conditions inflammatoires aiguës. Ce modèle peut également être envisagé sur le versant de la neurogastroentérologie comme un moyen unique d'étudier les effets d'un agent pathogène ou d'une substance pharmacologique sur les neurones entériques et les cellules gliales, et ainsi aider à l'identification de futures cibles thérapeutiques.

REFERENCES

- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M. (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961-71.
- 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.
- Alizai NK, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD. (1998) Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? *Pediatr Surg Int* 13:121-4.
- Anand BS, Malhotra V, Bhattacharya SK, Datta P, Datta D, Sen D. (1986) Rectal histology in acute bacillary dysentery. *Gastroenterology* 90:654-60.
- 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.
- Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F. (2006) Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55:630-7.
- Aulí M, Nasser Y, Ho W, Burgueño JF, Keenan CM, Romero C. (2008) Neuromuscular changes in a rat model of colitis. *Auton Neurosci* 141:10-21.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Bhimma R, Rollins NC, Coovadia HM, Adhikari M. (1997) Post-dysenteric hemolytic uremic syndrome in children during an epidemic of Shigella dysentery in Kwazulu/Natal. *Pediatr Nephrol* 11:560-4.
- 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.
- Blocker A, Gounon P, Cabiaux V, Larquet E, Parsot C and Sansonetti P. (1999). The tripartite secretion apparatus of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147, 683-93.
- 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.
- Bornstein JC, Costa M, Grider JR. (2004) Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:34-8.
- Bourdet-Sicard R, Ruediger M, Jockusch B, Gounon P, Sansonetti P and Tran Van Nhieu G. (1999). Binding of the *Shigella* IpaA protein to vinculin induces actin depolymerization. *EMBO J* 18, 5853-62.
- 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.
- Boyer L, Sidpra D, Jevon G, Buchan AM, Jacobson K (2007). Differential responses of VIPergic and nitroergic neurons in paediatric patients with Crohn's disease. *Auton Neurosci* 31;134:106-14.
- Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. (2007) Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 113:421-9.
- 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 et coll. (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93:189-201.
- 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.
- Brookes SJ, Meedeniya AC, Jobling P, Costa M. (1997) Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J Physiol* 505:473-91.

- Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, D'Hauteville H, Kunst F et coll. (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 38, 760-71.
- Butler T, Dunn D, Dahms B, Islam M (1989) Causes of death and the histopathologic findings in fatal shigellosis. *Pediatr Infect Dis J* 8:767-72.
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93.
- Carlier, M., Ressad, F. and Pantaloni, D. (1999). Control of actin dynamics in cell motility. *J Biol Chem* 274, 33827-30.
- Carvalho JL, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa J. (2001) Laparoscopic colonic mapping of dysganglionosis. *Pediatr Surg Int* 17:493-5.
- 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.
- 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.
- Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Grosso M, Petruzzelli R, Izzo P, Cali G, d'armiento FP, Rocco A, Nardone G, Iuvone T, Steardo L, Cuomo R. (2009) Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol Motil*.
- Clerc, P. and Sansonetti, P.J. (1987). Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect Immun* 55, 2681-8.
- Collins SM. (1996) The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111:1683-99.
- 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, 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.
- Cooke HJ, Sidhu M, Wang YZ. (1997) 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil* 9:181-6.
- 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.
- 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.

- da Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correa-Oliveira R, Reis D. (2009) Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Hum Pathol* 40:244-51.
- 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, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De Ponti F, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA, Mawe GM. (2004) Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 126:1872-83.
- 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.
- Dignass AU, Becker A, Spiegler S, Goebell H. (1998) Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur J Clin Invest* 28:554-61.
- Egile, C., Loisel, T., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. and Carlier, M. (1999). Activation of the cdc42 effector N-WASPP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by the Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146, 1319-32.
- Fernandez, M.I., Thuizat, A., Pedron, T., Neutra, M., Phalipon, A. and Sansonetti, P.J. (2003). A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis. *Cell Microbiol* 5, 481-91.
- Ferrante M, de Hertogh G, Hlavaty T, D'Haens G, Penninckx F, D'Hoore A, Vermeire S, Rutgeerts P, Geboes K, van Assche G. (2006) The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 130:1595-606.
- 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.
- 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.
- Frost JA, Willshaw GA, Barclay EA, Rowe B, Lemmens P, Vandepitte J. (1985) Plasmid characterization of drug-resistant *Shigella dysenteriae* 1 from an epidemic in Central Africa. *J Hyg* 94:163-72.
- 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.
- 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.
- 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.
- Geboes K, Collins S. (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil* 10:189-202.
- 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.
- Greenwood SM, Mizielinska SM, Frenguelli BG, Harvey J, Connolly CN. (2007) Mitochondrial dysfunction and dendritic beading during neuronal toxicity. *J Biol Chem* 282:26235-44.
- Hall NJ, Kufeji D, Keshtgar A. (2009) Out with the old and in with the new: a comparison of rectal suction biopsies with traditional and modern biopsy forceps. *J Pediatr Surg* 44:395-8.
- Hallgren A, Flemstrom G, Nylander O. (1998) Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* 275:G95-103.
- 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.
- 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.
- Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, Wegner M, Schemann M, Michel K, Rühl A. (2008) Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 509:356-71.
- 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.

- 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.
- Hueck, C.J. (1998). Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62,379-433.
- 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.
- 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.
- Ji S, Park H, Lee D, Song YK, Choi JP, Lee SI. (2005) Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with Shigella infection. *J Gastroenterol Hepatol* 20:381-6.
- Jiang MM, Surprenant A. (1992) Re-innervation of submucosal arterioles by myenteric neurones following extrinsic denervation. *J Auton Nerv Syst* 37:145-54.
- Kantsevov SV, Adler DG, Conway JD, Diehl DL, Farraye FA, Kwon R, Mamula P, Rodriguez S, Shah RJ, Wong Kee Song LM, Tierney WM and the ASGE Committee. (2008) Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc* 68:11-8.
- 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⁻ secretion via afferent neurons and 5-HT₄ receptors. *Am J Physiol* 277:G515-20.
- 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.
- Keusch GT, Bennish ML. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. (1989) *Pediatr Infect Dis J* 8:713-9.
- Kim DW, Lenzen G, Page AL, Legrain P, Sansonetti PJ and Parsot C. (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14046-51.
- Kim HS, Kim MS, Ji SW, Park H. (2006) The development of irritable bowel syndrome after Shigella infection: 3 year follow-up study. *Korean J Gastroenterol* 47:300-5.

- Kim, M., Ogawa, M., Fujita, Y., Yoshikawa, Y., Nagai, T., Koyama, T., Nagai, S., Lange, A., Fassler, R. and Sasakawa, C. (2009). Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. *Nature* 459, 578-82.
- Kimura AC, Johnson K, Palumbo MS, Hopkins J, Boase JC, Reporter R, Goldoft M, Stefonek KR, Farrar JA, Van Gilder TJ, Vugia DJ. (2004) Multistate shigellosis outbreak and commercially prepared food, United States. *Emerg Infect Dis* 10:1147-9.
- 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.
- King SK, Sutcliffe JR, Hutson JM. (2005) Laparoscopic seromuscular colonic biopsies: a surgeon's experience. *J Pediatr Surg*. 2005 Feb;40(2):381-4.
- 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.
- Kirchgessner AL, Tamir H, Gershon MD. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. (1992) *J Neurosci* 12:235-48.
- Kirchgessner AL, Liu MT, Alcantara F. Excitotoxicity in the enteric nervous system. (1997) *J Neurosci* 17:8804-16.
- 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.
- 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.
- Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K. and Levine, M.M. (1999). Global burden of Shigella infections. implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 77, 651-66.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Oct;17(5):751-60.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lourenszen S, Miller KG, Blennerhassett MG. (2009) Discrete responses of myenteric neurons to structural and functional damage by neurotoxins in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G228-39.
- Lunelli, M., Lokareddy, R.K., Zychlinsky, A. and Kolbe, M. (2009). IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9661-6.
- 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.
- Mathan MM, Chandy G, Mathan VI. (1995) Ultrastructural changes in the upper small intestinal mucosa in patients with cholera. *Gastroenterology*. 109:422-30.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ménard R, Dehio C, Sansonetti PJ. (1996) Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of Shigella. *Trends Microbiol* 4:220-6.
- Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology*. 2009 Jun;136(7):2214-25.e1-3.
- 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.
- Mounier J, Popoff MR, Enninga J, Frame MC, Sansonetti PJ, Van Nhieu GT. The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during Shigella invasion of epithelial cells. (2009) *PLoS Pathog* 5:e1000271.
- Munakata K, Fukuzawa M, Nemoto N. (2002) Histologic criteria for the diagnosis of allied diseases of Hirschsprung's disease in adults. *Eur J Pediatr Surg* 12:186-91.
- 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, 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, Dobрева G, Schemann M. (1999) Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* 517:533-46.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse 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.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP. (2003b) 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. (2003c) 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, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP. (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G231-41.
- Newgreen D, Young HM. (2002) Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-49.
- Niyogi SK. (2007) Increasing antimicrobial resistance--an emerging problem in the treatment of shigellosis. *Clin Microbiol Infect* 13:1141-3.
- Ng SC, Lied GA, Kamm MA, Sandhu F, Guenther T, Arebi N. (2009) Predictive value and clinical significance of myenteric plexitis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.
- 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.
- 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
- 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.
- Perdomo, O.J., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Ohayon, H., Gounon, P. and Sansonetti, P.J. (1994). Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med* 180, 1307-19.
- Philpott, D.J., Edgeworth, J.D. and Sansonetti, P.J. (2000). The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection. lessons from in vitro and in vivo studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 575-86.
- 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.
- 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.
- Pontell L, Castelucci P, Bagyánszki M, Jovic T, Thacker M, Nurgali K, Bron R, Furness JB. (2009) Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. *Virchows Arch* 455:55-65.
- Rabbani, G.H., Albert, M.J., Rahman, H., Islam, M., Mahalanabis, D., Kabir, I., Alam, K. and Ansaruzzaman, M. (1995). Development of an improved animal model of shigellosis in the adult rabbit by colonic infection with *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* 63, 4350-7.
- Rajan E, Gostout CJ, Lurken MS, Talley NJ, Locke GR, Szarka LA, Sumiyama K, Bakken TA, Stoltz GJ, Knipschild MA, Farrugia G. (2008) Endoscopic "no hole" full-thickness biopsy of the stomach to detect myenteric ganglia. *Gastrointest Endosc* 68:301-7.
- Raqib, R., Lindberg, A.A., Wretling, B., Bardhan, P.K., Andersson, U. and Andersson, J. (1995). Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect Immun* 63, 289-96.
- 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.

- 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.
- 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.
- Rout, W.R., Formal, S.B., Giannella, R.A. and Dammin, G.J. (1975). Pathophysiology of Shigella diarrhea in the rhesus monkey. intestinal transport, morphological, and bacteriological studies. *Gastroenterology* 68, 270-8.
- 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.
- Talukder KA, Dutta DK, Safa A, Ansaruzzaman M, Hassan F, Alam K, Islam KM, Carlin NI, Nair GB, Sack DA. (2001) Altering trends in the dominance of Shigella flexneri serotypes and emergence of serologically atypical S. flexneri strains in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 39:3757-9.
- 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.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. (1999) Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-7.
- Sansonetti, P.J., David, M. and Toucas, M. (1980). Corrélation entre la perte d'ADN plasmidique et le passage de la phase I virulente à la phase II avirulente chez Shigella sonnei. *C. R. Acad. Sci. Paris T. 290 (D)*, 879-882.
- Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J. and Formal, S.B. (1981). Shigella sonnei plasmids. evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infect Immun* 34, 75-83.
- Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J. and Formal, S.B. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri. *Infect Immun* 35, 852-60.
- Sansonetti PJ, Arondel J, Fontaine A, d'Hauteville H, Bernardini ML. (1991) OmpB (osmo-regulation) and icsA (cell-to-cell spread) mutants of Shigella flexneri: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 9:416-22.
- Sansonetti, P.J. (2001). Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev* 25, 3-14.
- Sansonetti, P.J. (2004). War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol*, 4, 953-64.
- Sansonetti, P.J. (2006). Shigellosis. an old disease in new clothes? *PLoS Med* 3, e354.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132:1344-58.
- 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.

- Schemann M, Neunlist M. (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:55-9.
- 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.
- 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.
- Schulte-Bockholt A, Fink JG, Meier DA, Otterson MF, Telford GL, Hopp K, Koch TR. (1995) Expression of mRNA for vasoactive intestinal peptide in normal human colon and during inflammation. *Mol Cell Biochem* 12;142:1-7.
- Sidhu M, Cooke HJ. (1995) Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 269:G346-51.
- 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.
- Seydel, K.B., Li, E., Swanson, P.E. and Stanley, S.L., Jr. (1997). Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 65, 1631-9.
- 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.
- Shim, D.H., Suzuki, T., Chang, S.Y., Park, S.M., Sansonetti, P.J., Sasakawa, C. and Kweon, M.N. (2007). New animal model of shigellosis in the Guinea pig. its usefulness for protective efficacy studies. *J Immunol* 178, 2476-82.
- 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.
- Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Wakelin D, Scholefield JH, Spiller RC. (2008) Prolonged elevation of galanin and tachykinin expression in mucosal and myenteric enteric nerves in trinitrobenzene sulphonic acid colitis. *Neurogastroenterol Motil* 20:392-406.
- 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.
- Sumiyama K, Gostout CJ, Rajan E, Bakken TA, Knipschild MA. (2008) Chemically assisted endoscopic mechanical submucosal dissection by using mesna. *Gastrointest Endosc* 67:534-8.

- Sumiyama K, Tajiri H, Kato F, Imura T, Ono K, Ikeda K, Imazu H, Gostout CJ. Pilot study for in vivo cellular imaging of the muscularis propria and ex vivo molecular imaging of myenteric neurons (with video). (2009) *Gastrointest Endosc* 69:1129-34.
- Sutton I, Winer JB. (2002) The immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes. *Clin Sci (Lond)* 102:475-486.
- Struelens MJ, Patte D, Kabir I, Salam A, Nath SK, Butler T. (1985) Shigella septicemia: prevalence, presentation, risk factors, and outcome. *J Infect Dis* 152:784-90.
- 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.
- Swenson O, Fisher JH, Macmahon HE. (1955) Rectal biopsy as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 253:632-5.
- Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM. (2002) Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 51 Suppl 1:i6-10.
- Talukder, K.A., Dutta, D.K., Safa, A., Ansaruzzaman, M., Hassan, F., Alam, K., Islam, K.M., Carlin, N.I., Nair, G.B. and Sack, D.A. (2001). Altering trends in the dominance of Shigella flexneri serotypes and emergence of serologically atypical S. flexneri strains in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 39, 3757-9.
- Talukder KA, Khajanchi BK, Islam MA, Dutta DK, Islam Z, Khan SI, Nair GB, Sack DA. (2006) The emerging strains of Shigella dysenteriae type 2 in Bangladesh are clonal. *Epidemiol Infect* 134:1249-56.
- 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.
- 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.
- 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.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisie 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.

- Tran Van Nhieu G, Bourdet-Sicard R, Dumenil G, Blocker A and Sansonetti P. (2000). Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 2, 187-93.
- Tran Van Nhieu G, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P and Combettes L. (2003). Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 5, 720-6.
- Trendelenburg P. (1917) Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarm Peristaltik. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 81:55-129.
- Vanner S, Surprenant A. (1991) Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pig colon. *Am J Physiol* 261:G136-44.
- 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, Surprenant A. (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 271:G223-30.
- Vanner S. (2000) Myenteric neurons activate submucosal vasodilator neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G380-7.
- Vanner S, Macnaughton WK. (2004) Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:39-43.
- 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, Soinila S. (2001) Quantitative comparison of growth-associated protein-43 and substance P in ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 49:749-58.
- Voino-Yasenetsky, M.V. and Voino-Yasenetskaya, M.K. (1962). Experimental pneumonia caused by bacteria of the *Shigella* group. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 11, 439-54.
- 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.
- von Herbay A, Otto HF. (1992) Differential diagnosis of chronic inflammatory bowel diseases. Possibilities and limits of morphology. *Chirurg* 63:1-7.
- Von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, Canh do G, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, Bhutta ZA, Mason C, Sethabutr O, Talukder K, Nair GB, Deen JL, Kotloff K, Clemens J. (2006) A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med* e353.
- 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.
- 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, Kühnel 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 wholmount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. *Ann Anat* 181:327-37.
- Wood JD. (1994) Physiology of the enteric nervous system. Dans : Johnson LR, ed, *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3^{ème} édition. New York: Raven Press:423-482.
- 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.
- 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.
- Yoshikawa, M., Sasakawa, C., Okada, N., Takasaka, M., Nakayama, M., Yoshikawa, Y., Kohno, A., Danbara, H., Nariuchi, H., Shimada, H. et al. (1995). Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of *Shigella flexneri* 2a as a candidate live-attenuated oral vaccine. *Vaccine* 13, 1436-40.
- Zhao A, McDermott J, Urban JF Jr, Gause W, Madden KB, Yeung KA, Morris SC, Finkelman FD, Shea-Donohue T. (2003) 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.
- Zhang, Z., Jin, L., Champion, G., Seydel, K.B. and Stanley, S.L., Jr. (2001). *Shigella* infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model. role for neutrophils in containing bacterial dissemination in human intestine. *Infect Immun* 69, 3240-7.
- Zychlinsky, A., Fitting, C., Cavaillon, J.M. and Sansonetti, P.J. (1994). Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest* 94, 1328-32.

Neuropathies entériques : méthodes d'exploration et caractérisation dans un modèle expérimental humain de shigellose

Résumé : Le système nerveux entérique (SNE), constitué de neurones et de cellules gliales entériques, est un régulateur clef des fonctions digestives. Néanmoins, la nature des lésions du SNE au cours des principales pathologies digestives ainsi que le rôle de l'inflammation restent mal connus. Ce travail de thèse visait : 1) à développer une méthode permettant d'étudier les neuropathies du SNE chez l'homme, et 2) à caractériser *ex vivo* les atteintes du SNE dans le colon humain dans un modèle d'inflammation aiguë induite par *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques mis en cause. Dans un premier temps, nous avons montré la possibilité d'étudier le SNE sur des biopsies coliques humaines en combinant des approches immunohistochimiques et de Western blot du plexus sous-muqueux interne. Parallèlement, nous avons développé un modèle de culture organotypique afin de caractériser les interactions précoces entre le SNE et *S. flexneri*. Nous avons ainsi montré que *S. flexneri* induisait une plasticité neuronale bloquée par un inhibiteur de la NOS (L-Name), ainsi qu'une dégénérescence neuronale et gliale inhibée par un antagoniste des récepteurs NMDA au glutamate. Outre les lésions du SNE, nous avons montré que *S. flexneri* induisait des altérations majeures de la BEI et identifié le rôle clef de la sérine protéase SepA dans l'induction de ces lésions.

Mots-clés : système nerveux entérique, barrière épithéliale intestinale, inflammation, *Shigella flexneri*, plasticité neuronale, neurodégénérescence, VIP, L-Name, glutamate.

Enteric neuropathies: exploration methods and characterization in a human experimental model of shigellosis

Abstract : The enteric nervous system (ENS) is composed of neurons and enteric glial cells. It plays a major role in the regulation of digestive functions. However, the nature of ENS lesions during the majority of digestive disease, as well as the role of inflammation, is poorly understood. The aims of this study were : 1) to develop a routine method allowing characterisation of enteric neuropathies in humans, and 2) to characterise the ENS alterations *ex vivo* in a human colonic model of shigella infection and identify the mechanisms involved. Firstly, we demonstrated the accuracy of human colonic biopsies to study the ENS, by combining immunohistochemical and Western blot methods. Secondly, we developed an organotypic culture model to study early interactions between the ENS and *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), and showed that *S. flexneri* induced a neuronal plasticity that was blocked by NOS inhibitor (L-Name), as well as neuronal and glial damages that were prevented by NMDA receptors to glutamate. Beyond ENS alterations, we also noted a major disruption of the intestinal epithelial barrier and identified the key role of the SepA serine protease in these alterations.

Key words : enteric nervous system, intestinal epithelial barrier, inflammation, *Shigella flexneri*, neuronal plasticity, neuronal damages, VIP, L-Name, glutamate.

Emmanuel CORON

INSERM U913, Hôtel-Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes cedex