

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

EFFETS DE LA STIMULATION DES RACINES SACREES SUR LA  
BARRIERE EPITHELIALE DIGESTIVE DANS UN MODELE  
PRE-CLINIQUE PORCIN

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : BIOLOGIE SANTE

Discipline : BIOLOGIE-MEDECINE-SANTE

Spécialité : PHYSIOLOGIE DIGESTIVE

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Guillaume MEURETTE**

le 22 Février 2013, devant le jury ci-dessous

***Président :***

***Rapporteurs :***

Mr le professeur Bruno Bonaz

Mr le professeur Laurent Siproudhis

***Examineurs :***

Mr le docteur Charles-Henri Malbert

Mr le docteur Arnaud Bourreille

***Directeur de thèse :***

Mr le docteur Michel Neunlist

***Co-directeur :***

Mr le docteur Emmanuel Coron

## Remerciements

*Au professeur Bruno Bonaz. Vous avez accepté de juger et d'être rapporteur pour ce travail, je vous en suis très reconnaissant. Votre expérience dans le domaine de la neuro-gastroentérologie est un exemple pour nombre de jeunes chercheurs et médecins, ouvrant des nouvelles voies de recherches et de stratégies thérapeutiques. Les échanges partagés dans les congrès traduisent naturellement votre enthousiasme pour cette jeune spécialité. Puisse votre lecture apporter à ce travail une évaluation critique qui permettra d'enrichir cette voie de recherche.*

*Au professeur Laurent Siproudhis. Tu acceptes pour la seconde fois de juger mon travail et mon parcours, cette fois en qualité de rapporteur et je t'en remercie infiniment. Dix ans après nos premières rencontres sur l'ulcère solitaire du rectum, le temps passé n'aura fait qu'accentuer les liens qui nous unissent au travers de la colo-proctologie. C'est avec beaucoup de plaisir et d'attente que je soumetts à ton jugement ce travail. Puisse-t-il être le témoin de mon admiration et ma reconnaissance.*

*Au docteur Charles-Henri Malbert. Vous avez accepté de participer au jury de ma thèse, je vous en remercie chaleureusement. Le développement d'un modèle préclinique chez le grand animal nous rapproche de la clinique. Votre expérience dans ce domaine fait référence, les nombreuses publications de votre équipe sur le modèle porcin en témoignent. Je suis honoré que vous acceptiez de juger ce travail.*

*Au docteur Arnaud Bourreille. Mon cher Arnaud, tu me précèdes (de peu) dans le parcours clinique et de recherche au sein de l'IMAD. Tu donnes l'exemple d'un partenariat entre médecins et chirurgiens qui nous grandit. Tu as su créer autour des MICI un véritable parcours de soins et de recherches qui m'a permis de développer la chirurgie, je te remercie de ta confiance. Tu as accepté de juger ce travail qui pourrait un jour se traduire par une application pratique dans notre quotidien, je t'en remercie vivement.*

*Au docteur Emmanuel Coron. Tu as accepté de diriger ma thèse avec Michel à la suite du PrGalmiche, je t'en remercie. C'est pour moi un plaisir quotidien de pouvoir partager avec l'endoscopiste que tu représentes nos interrogations et notre volonté d'améliorer la prise en charge conjointe médico-chirurgicale des patients. Nos choix étaient différents après l'internat, entre chirurgie et médecine, mais les évolutions font que nous travaillons vraiment ensemble au quotidien pour mon plus grand plaisir. J'espère que l'unité de recherche sera, avec le bloc opératoire, notre autre point de rencontre et de discussion pour l'avenir.*

*Au docteur Michel Neunlist. Mon cher Michel, voici le travail de thèse soumis à jugement, mais j'ai bien compris que ce n'était qu'une étape vers le développement d'autres projets. On dit qu'une unité de recherche est à l'image de son directeur : l'U913 est un lieu unique d'échanges, d'ouverture, de projets où se côtoient les jeunes et les moins jeunes, médecins, chercheurs et même chirurgiens ! Je ne saurais te remercier assez de l'accueil et de l'optimisme dont tu as fait part pour diriger ce projet et le mener à bien. J'aurai au moins essayé de mettre du liant dans la thèse...*

*Je remercie chaleureusement les Masters qui ont pris une part importante dans ce projet, Mme Emilie Duchalais, Mme Claire Louis et Mme Marie Dewitte. Votre implication était indispensable, vous avez su acquérir l'autonomie suffisante pour faire avancer les manips, si les résultats obtenus sont encourageants, c'est bien grâce à vous 3...*

*Je remercie toute l'unité 913 pour la qualité de son accueil et l'aide précieuse qu'ils ont pu me fournir à chaque étape de ce travail, particulièrement Mandy Biraud, Sabrina Coquenlorge, Julien Chevalier, Philippe Aubert, Laurianne Van Landeghem et Bernard Lardeux. François aussi pour les quelques dimanche soir...*

*Merci au Professeur Roger Robert pour ses explications sur l'innervation du pelvis.*

*Merci particulier au Laboratoire des Grands Animaux, le Professeur Gilles Blancho, Jérémie Hervouet et David Minault. Vous avez toujours répondu présents et partagé notre enthousiasme pour les expérimentations. Sans votre professionnalisme et votre dynamisme, nous n'aurions pas pu mener ce projet à terme. L'avenir j'espère nous rapprochera encore avec l'école de chirurgie qui prend forme.*

*Je remercie le Professeur Paul-Antoine Lehur qui me montre le chemin à suivre depuis plusieurs années*

*Je remercie la région des Pays de la Loire, soutien du projet NEUROMIC, sans laquelle ce travail n'aurait pas pu se réaliser.*

*A ma famille*

*Aurélie,*

*Emilie, Titouan et Léa*

Sommaire .....	3
Abréviations .....	5
Résumé .....	6
<i>1<sup>ière</sup> partie Mise au point</i> .....	8
I. Introduction générale .....	9
II. La barrière épithéliale intestinale (BEI) .....	12
1. Composants intrinsèques de la BEI .....	12
2. Composant extrinsèque de la BEI .....	15
3. Restauration de l'intégrité de la BEI .....	15
4. Fonctions de la BEI .....	16
5. Altérations de la BEI au cours de l'inflammation .....	19
III. Innervation intrinsèque de l'intestin : le système nerveux entérique (SNE) .....	21
1. Développement du SNE .....	21
2. Anatomie descriptive du SNE .....	22
3. Composants du SNE .....	24
3.1 Les neurones .....	24
3.2 Les cellules gliales entériques (CGE) .....	25
4. Contrôle des fonctions digestives par le SNE .....	27
4.1 Influence du SNE sur la BEI .....	27
4.1.1 SNE et la perméabilité para-cellulaire .....	30
4.1.2 SNE et prolifération des cellules épithéliales .....	31
4.1.3 Autres implications du SNE sur la BEI .....	32
4.1.4 Modifications du SNE en situation inflammatoire .....	33
4.2 Influence du SNE sur la motricité digestive .....	35
IV. Innervation extrinsèque de l'intestin : le système sympathique et parasymphatique .....	37
1. Développement de l'innervation extrinsèque .....	37
2. Anatomie descriptive du système sympathique / parasymphatique .....	38
2.1 Voies efférentes .....	39
2.2 Voies afférentes .....	40
3. Influence du système sympathique et parasymphatique sur les fonctions digestives .....	42
3.1 Influence sur la motricité digestive .....	42
3.2 Influence sur la perméabilité para-cellulaire et l'inflammation .....	44
4. Particularités de l'innervation extrinsèque des organes pelviens .....	45
V. Neurostimulation digestive chez l'homme .....	50
1. Stimulation directe de la paroi digestive .....	50
2. Stimulation vagale .....	50
3. Stimulation des racines sacrées (SRS) .....	51
3.1 Indications de la SRS .....	51
3.1.1 Historique .....	52
3.1.2 Résultats de la SRS en pathologie digestive .....	52
3.1.2.1 L'incontinence anale .....	52

3.1.2.2 Constipation et intestin irritable .....	55
3.1.2.3 Syndromes douloureux chroniques .....	56
3.1.2.4 Pathologies inflammatoires .....	57
3.2 Déroulement pratique de la SRS .....	57
3.2.1 Mise en place de l'électrode .....	58
3.2.2 Période de test de la SRS .....	60
3.2.3 Implantation définitive .....	60
3.3 Stimulation bilatérale .....	63
4. Mode d'action de la SRS .....	63
4.1 Cibles potentielles de la SRS .....	63
4.2 Hypothèses du mécanisme d'action global de la SRS .....	65
4.3 Interrogations actuelles sur le mode d'action de la SRS .....	67
2 <sup>ème</sup> partie : Objectifs de la thèse .....	69
3 <sup>ème</sup> partie : Résultats .....	71
I. Elaboration d'un modèle de SRS percutanée chez le porc .....	71
II. Effets de la SRS aiguë sur la BEI .....	79
III. Standardisation de biopsies profondes pan-pariétales étagées du côlon pour étude de la BEI et du SNE par voie endoscopique dans le modèle porcin .....	93
IV. Développement d'un modèle chronique de SRS avec évaluation des effets sur la BEI en termes de perméabilité, d'expression des protéines de jonction, de réponse inflammatoire locale et systémique et de transmission neuromusculaire .....	104
V. Efficacité de la SRS dans le traitement de la rectocolite hémorragique résistante au traitement médical. Expérience d'un cas clinique .....	133
4 <sup>ème</sup> partie : Discussion générale .....	144
5 <sup>ème</sup> partie : Conclusion et perspectives .....	153
Références bibliographiques .....	156

## Abréviations

<b>Ach</b>	Acetylcholine
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AH</b>	After hyperpolarisation
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BEI</b>	Barrière épithéliale intestinale
<b>CEI</b>	Cellule épithéliale intestinale
<b>CGE</b>	Cellule gliale entérique
<b>CHAT</b>	Cholin-acetyltransferase
<b>COMT</b>	Catechol-o-methyltransferase
<b>DSS</b>	Dextran sodium sulfate
<b>EFS</b>	Electricalfield stimulation
<b>GDNF</b>	Glial-derivedneurotrophic factor
<b>GFAP</b>	Glial fibrillaryacidicprotein
<b>GLP-2</b>	Glucagon-like peptide 2
<b>IBS</b>	Inflammatoryboweldisease
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IPAN</b>	Intrinsecprimaryafferent nerve
<b>JAM</b>	Junction adhesionmolecule
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MAO</b>	Monoamine oxydase
<b>MICI</b>	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
<b>MLC</b>	Myosin light chain
<b>MLCP</b>	Phospho-myosin light chain
<b>NO</b>	Nitric oxyde
<b>NOS</b>	Nitric oxyde synthase
<b>PACAP</b>	Pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide
<b>PCR</b>	Polymerasechainreaction
<b>RCH</b>	Rectocolite hémorragique
<b>S100<math>\beta</math></b>	S-100 calcium binding protein $\beta$
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNE</b>	Système nerveux entérique
<b>SOM</b>	Somatostatin
<b>SP</b>	Substance P
<b>SRS</b>	Stimulation des racines sacrées
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Transforminggrowth factor $\beta$
<b>TNBS</b>	2,4,6Trinitro-benzenesulfonicacid
<b>TNF</b>	Tumornecrosis factor
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
<b>VIP</b>	Vasointestinal peptide
<b>ZO-1</b>	Zonulaoccludens 1

## **Résumé :**

**Introduction :** La barrière épithéliale intestinale (BEI) est une interface entre la lumière digestive et le milieu interne. Elle est composée d'une monocouche de cellules épithéliales reposant sur une lame basale et rattachées les unes aux autres par des complexes jonctionnels. Le maintien de son intégrité est indispensable à l'homéostasie. Les lésions de la BEI sont impliquées dans de nombreuses pathologies digestives. Le système nerveux entérique (SNE) est étroitement impliqué dans le maintien de l'homéostasie digestive et, en particulier, le contrôle des fonctions de la BEI. Il est composé de neurones et de cellules gliales qui exercent la double fonction de régulation de la BEI mais aussi de la motricité digestive. Le SNE est également sous l'influence d'une innervation extrinsèque représentée par le système sympathique/parasympathique. Ce dernier exerce à son tour une régulation sur le SNE. La neurostimulation digestive, par l'intermédiaire de l'innervation extrinsèque, peut avoir une influence sur le SNE et la BEI. Parallèlement, la stimulation des racines sacrées (SRS) a été évaluée dans la prise en charge de l'incontinence anale. Si la SRS s'est développée en pratique clinique, avec une amélioration démontrée des patients souffrant d'incontinence anale, son mécanisme d'action précis n'a pas encore été démontré, en particulier son effet sur la BEI au niveau du rectum.

**Objectifs de la thèse :** Développer un modèle préclinique porcin de SRS pour évaluer les effets de la stimulation aiguë sur la perméabilité para-cellulaire et les modifications histologiques de la muqueuse rectale. Mettre au point des techniques de biopsies profondes en endoscopie pour une étude couplée de la BEI et du SNE dans les différentes couches de la paroi colique. Évaluer les effets à plus long terme (7 jours) de la SRS sur la BEI. Enfin évaluer chez l'homme, à partir d'un cas de rectocolite hémorragique les effets de la SRS dans un modèle de lésion de la BEI.

**Résultats :** Notre étude a montré que le modèle préclinique porcin de SRS était faisable et reproductible. Dans un premier article, nous avons montré que la SRS avait à court terme un effet sur la BEI à type de réduction de la perméabilité para-cellulaire. Ce renforcement était associé à une diminution de l'épaisseur de l'épithélium de la muqueuse du rectum, ainsi qu'une augmentation du mucus à sa surface. Dans un deuxième article, nous avons montré que la réalisation de biopsies coliques panpariétales était possible en endoscopie, et permettait d'explorer la BEI (Perméabilité para-cellulaire) mais également le SNE (transmission neuromusculaire ex-vivo). Dans un troisième article (soumis), nous avons montré que la SRS à plus long-terme (7 jours) ne modifiait pas la perméabilité para-cellulaire en condition basale, mais protégeait la BEI de l'augmentation de la perméabilité en situation de stress, induit par adjonction ex-vivo d'un agoniste PAR(2) lors de l'évaluation de la perméabilité para-cellulaire. De même, la SRS protégeait la BEI d'une diminution de l'expression de m RNA de Zonula Occludens 1. Parallèlement, l'expression de m RNA de cytokines pro-inflammatoires n'était pas modifiée en condition basale, mais la SRS diminuait l'expression de m RNA d'IL-6 dans un modèle ex-vivo de stress ischémique (culture organotypique). Les animaux stimulés avaient également moins de réponse inflammatoire générale (polynucléose neutrophile). Par ailleurs, la transmission neuromusculaire était également modifiée avec une hyperexcitabilité non médiée par l'adjonction de Carbachol, en faveur d'une origine neuronale. Enfin, dans un cas clinique (soumis), nous avons montré que la SRS pouvait avoir un effet thérapeutique avec une amélioration à la fois clinique, endoscopique et histologique chez un patient pris en charge pour RCH basse.

**Conclusion :** Notre étude a permis de constituer un modèle préclinique porcin de SRS indispensable à l'évaluation de ses effets sur la muqueuse rectale et la BEI. Nous avons montré que la BEI était influencée par la SRS sous forme d'un renforcement de sa perméabilité à un stade précoce de stimulation, puis à long terme une normalisation de la perméabilité, mais en maintenant une

*diminution de la sensibilité de la BEI à l'agression. Parallèlement, nous avons observé un effet thérapeutique dans un cas clinique d'agression de la BEI, la RCH.*

***Mots clés :***

*Barrière épithéliale intestinale / Système nerveux entérique / Stimulation des racines sacrées*

Première partie

Mise au point

## **I. Introduction générale**

L'appareil digestif est une interface entre l'environnement source de nutriments indispensables à l'individu, mais également de toxiques menaçant son intégrité, et un milieu interne maintenant une homéostasie. Cet appareil se compose d'un intestin long d'environ 5 à 6 mètres et de glandes exocrines annexes (appareil hépato-bilio-pancréatique).

Une des principales fonctions de l'intestin est la motricité digestive. Cette motricité englobe plusieurs programmes moteurs responsables de la progression du bol alimentaire. Elle est assurée par l'activité coordonnée de la musculature lisse de la paroi répartie en 2 couches : l'une musculuse circulaire et l'autre longitudinale. Les propriétés motrices ne sont pas uniformes, mais spécifiques aux différents organes qui composent le tube digestif. C'est l'association des différents programmes moteurs propres aux organes spécifiques du tube digestif qui assure la propagation homogène du bol alimentaire depuis l'œsophage, l'estomac puis le pylore, le duodénum, l'intestin grêle, le côlon jusqu'au rectum et au sphincter anal.

Une autre fonction clé du tube digestif est la capacité de la muqueuse, et en particulier son épithélium, à créer des échanges avec l'environnement. La fonction d'absorption de nutriments, d'électrolytes et d'eau est particulièrement indispensable au métabolisme de l'organisme. Ce faisant il est aussi en contact avec des agents toxiques (chimiques ou infectieux) susceptibles de l'endommager. Parallèlement à cette fonction cellulaire d'échange, il constitue une véritable barrière contre les agressions extérieures, garant de l'intégrité de l'organisme. L'épithélium de la muqueuse est une surface dynamique en perpétuel renouvellement. La barrière épithéliale intestinale (BEI) résulte de la combinaison de 2 barrières : une barrière intrinsèque formée par la monocouche de cellules épithéliales qui tapisse la muqueuse, et une barrière extrinsèque formée par le produit de sécrétion des cellules épithéliales, le mucus, les ions chlorures, les peptides antibactériens. Ces deux fonctions sont sous contrôle des systèmes nerveux entérique (SNE), intrinsèque au tube digestif, et extrinsèque au tube digestif (système nerveux sympathique, parasympathique et le cerveau).

Le SNE, réparti tout au long de l'appareil digestif est intégré à la paroi intestinale à l'interface des couches musculuses (plexus myentérique) et dans la sous-muqueuse (plexus sous-muqueux). A cette double localisation correspond schématiquement ses 2 rôles principaux : moduler la motricité digestive principalement par le plexus myentérique, et réguler le fonctionnement de BEI par le plexus sous-muqueux. Il existe néanmoins des connexions entre plexus myentérique et sous-muqueux de sorte que les activités des deux composants sont étroitement liées. Cette organisation neurologique propre à la paroi intestinale est unique dans l'organisme. Elle confère au tube digestif un fonctionnement autonome : même en situation de déconnexion complète des afférences et efférences nerveuses extrinsèque au tube digestif, le SNE peut coordonner ces deux fonctions.

L'activité du SNE est modulée par le système sympathique/parasympathique qui exerce une influence sur le fonctionnement de l'intestin. Elle s'effectue via des neurones efférents issus des noyaux situés dans la corne intermedio-latérale de la moëlle épinière pour le système sympathique et des noyaux centraux des nerfs vagues et pré-sacrés pour le parasympathique. De surcroît, les nerfs extrinsèques véhiculent également des afférences en direction du système nerveux central (SNC) assurant un échange entre SNE et SNC, créant un axe cerveau-intestin. Les connexions sous-corticales ne sont pas précisément connues à ce jour, mais elles donnent à la fois la possibilité au SNC de moduler le fonctionnement intestinal, et à l'inverse, au tube digestif de moduler l'activité du SNC.

La neurostimulation digestive vise actuellement à moduler principalement le fonctionnement moteur du tube digestif en administrant un courant électrique avec des paramètres (fréquence, amplitude, intensité) variables. Elle est utilisée principalement dans des pathologies digestives comme la gastroparésie, les vomissements ou l'incontinence anale. Plusieurs procédures de stimulation sont utilisées en fonction des objectifs thérapeutiques chez l'homme : la stimulation pariétale directe (gastrique), la stimulation vagale ou bien la stimulation des racines sacrées (SRS). Des travaux récents effectués principalement chez le petit animal, ont montré que les effets de la neurostimulation ne se limiteraient pas à moduler l'activité motrice mais pourraient aussi avoir des effets anti-inflammatoire, ou encore renforcer la BEI. A ce jour pourtant, la capacité de la SRS à impacter sur les fonctions de la BEI ou inflammatoire reste inconnue. La SRS cible son action sur le fonctionnement du côlon gauche,

du rectum et de l'anus. Son indication principalement reconnue est l'incontinence anale. Dans cette indication, elle est pratiquée régulièrement en clinique, avec une amélioration significative du confort des patients. En revanche, son mode d'action reste très partiellement connu, en particulier son effet sur la BEI.

## **II. La barrière épithéliale intestinale**

Au sein d'un épithélium digestif organisé sous forme de villosités pour augmenter la surface d'échange avec le milieu luminal (**Figure 1**), la BEI joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en assurant à la fois sa protection contre le contenu de la lumière digestive avec les agents pathogènes, et le contrôle des échanges entre lumière digestive et milieu interne. Cette double fonction de la BEI est assurée par la monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) maintenues les unes aux autres et sur la membrane basale via des complexes protéiques spécialisés et distincts. On peut distinguer en pratique une barrière intrinsèque représentée par les cellules épithéliales, et une barrière extrinsèque formée par les produits de sécrétion des cellules épithéliales (mucus ; électrolytes ; peptides anti microbiens).

### **1. Composants intrinsèques de la BEI : Les cellules épithéliales intestinales**

Il existe quatre types principaux de CEI issues des cellules souches intestinales: les cellules absorbantes ou entérocytes, les cellules mucosécrétantes (ou caliciformes à mucus), les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth.

Les cellules souches intestinales à l'origine des différentes cellules épithéliales différenciées sont majoritairement localisées à la base des cryptes villositaires, même si leur topographie exacte est encore débattue (Barker et al., 2008; Marshman et al., 2002; Sangiorgi and Capecchi, 2008).

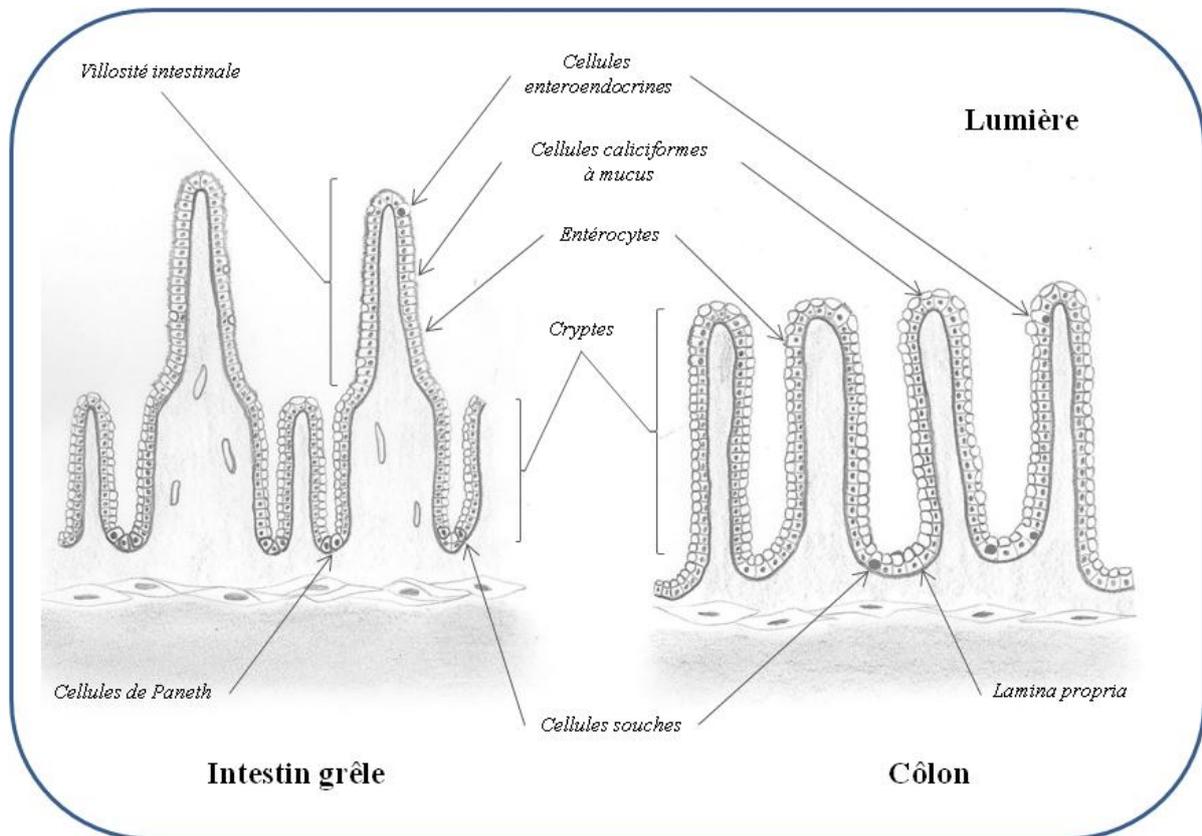
Les entérocytes sont les cellules responsables de l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Leur pôle apical présente des microvillosités (bordure en brosse) riches en glycoprotéines qui forment notamment les enzymes et les transporteurs. Elles sont également recouvertes de glycolipides formant le glycocalix au rôle protecteur (Patsos and Corfield, 2009). Elles se trouvent au sommet des villosités. Elles représentent 80% des CEI.

Les cellules caliciformes à mucus représentent environ 15% des CEI, leur densité est croissante du duodénum au côlon. On les retrouve réparties sur toute la hauteur de la villosité et de la crypte intestinale. Elles concentrent à leur pôle apical des granules de mucines (glycoprotéines de haut poids moléculaire) qui sont sécrétés par exocytose dans la lumière digestive et constituent le mucus.

Les cellules de Paneth se trouvent au fond des cryptes de l'intestin et sont absentes en situation physiologique dans le colon. Elles secrètent de nombreuses substances anti-microbiennes dans la lumière intestinale. Leur rôle principal est immunitaire (immunité innée). Ainsi, elles secrètent lysozyme, phospholipase A2 et défensines (Wehkamp and Stange, 2006).

Les cellules entéroendocrines les plus fréquentes sont présentes tout au long de l'intestin et secrètent la sérotonine (5-Hydroxytryptamine). Les autres cellules secrètent la cholecystokinine (Cellules I), la sécrétine (cellules S), le GIP (Gastrointestinalinhibitory peptide) (cellules K), motiline (cellules M) ou la neurotensine (cellules N). Ces cellules sont présentes uniquement dans la muqueuse de l'intestin grêle. Les cellules L et D secrètent respectivement le Pancréatic Polypeptide-like peptide et la somatostatine. Ces dernières sont présentes dans tout l'intestin. Enfin certaines cellules peuvent sécréter des hormones telles que la gastrine, la substance P et le VIP (vasointestinal peptide) (Rindi et al., 2004).

L'épithélium qui tapisse le tube digestif est remplacé intégralement tous les 4 à 5 jours et nécessite la production de 10 milliards de nouvelles cellules par jour (Bullen et al., 2006; van der Flier et al., 2009). Il existe ainsi constamment au sein de ces populations cellulaires un équilibre entre prolifération, différenciation et exfoliation (Potten, 1997; Potten and Grant, 1998).



**Figure 1 :** Coupes schématiques de la muqueuse intestinale au niveau de l'intestin grêle et du côlon montrant les différences d'organisation de l'architecture des villosités et des cryptes selon la topographie, ainsi que la répartition des différents types cellulaires formant l'épithélium intestinal.

## **2. Composant extrinsèque de la BEI : mucus et sécrétions hydro-électrolytiques**

Parallèlement à la barrière physique que représente l'épithélium de la muqueuse intestinale, à sa surface, se trouve le composant extrinsèque de la BEI qui constitue souvent le premier rempart contre l'agression du milieu luminal. En effet, une couche de mucus sécrétée par les CEI tapisse la surface épithéliale et constitue une ligne de défense contre l'adhésion et la pénétration de toxines, bactéries et antigènes (Frey et al., 1996). Ce mucus a un rôle de lubrification en limitant le frottement lié au passage du bol alimentaire. Il intervient aussi pour protéger la muqueuse intestinale en formant une barrière physique contre les molécules de grande taille présentes dans la lumière digestive (toxines) en raison de l'encombrement stérique créée par les chaînes oligosaccharidiques. Enfin, grâce aux mucines de charge anionique, le mucus constitue également une barrière de diffusion sélective contre les molécules anioniques de petite taille (Allen et al., 1998).

## **3. Restauration de l'intégrité de la BEI**

La BEI est soumise en permanence à des agressions physiques telles que les déformations répétées de la muqueuse sous l'effet du péristaltisme, ou le passage du bol alimentaire pouvant créer des lésions de surface de la BEI (Chaturvedi et al., 2007). Sollicités en permanence, des processus de réparation de la BEI assurent la restauration de l'intégrité nécessaire à son fonctionnement. Ces processus comprennent 3 étapes séquentielles qui, en réalité, se superposent chronologiquement (Sturm and Dignass, 2008) :

La restauration épithéliale résulte directement de la mobilité des CEI se caractérise par l'étalement des cellules autour de la zone lésionnelle pour rétablir au plus vite la continuité de l'épithélium (Lacy, 1988).

Prolifération puis différenciation de cellules suivent l'étape d'étalement si celui-ci ne suffit pas à restaurer l'intégrité de surface (Lacy, 1988). Lorsque les lésions sont superficielles, la réparation de la BEI ne dure que quelques heures (Podolsky, 1999). Lorsque la lésion est profonde, la réparation peut

prendre plusieurs jours et implique également un remodelage de la matrice extracellulaire et de la sous-muqueuse. Parfois ce processus est altéré, notamment en cas de fibrose lorsqu'il existe un excès de production de collagène.

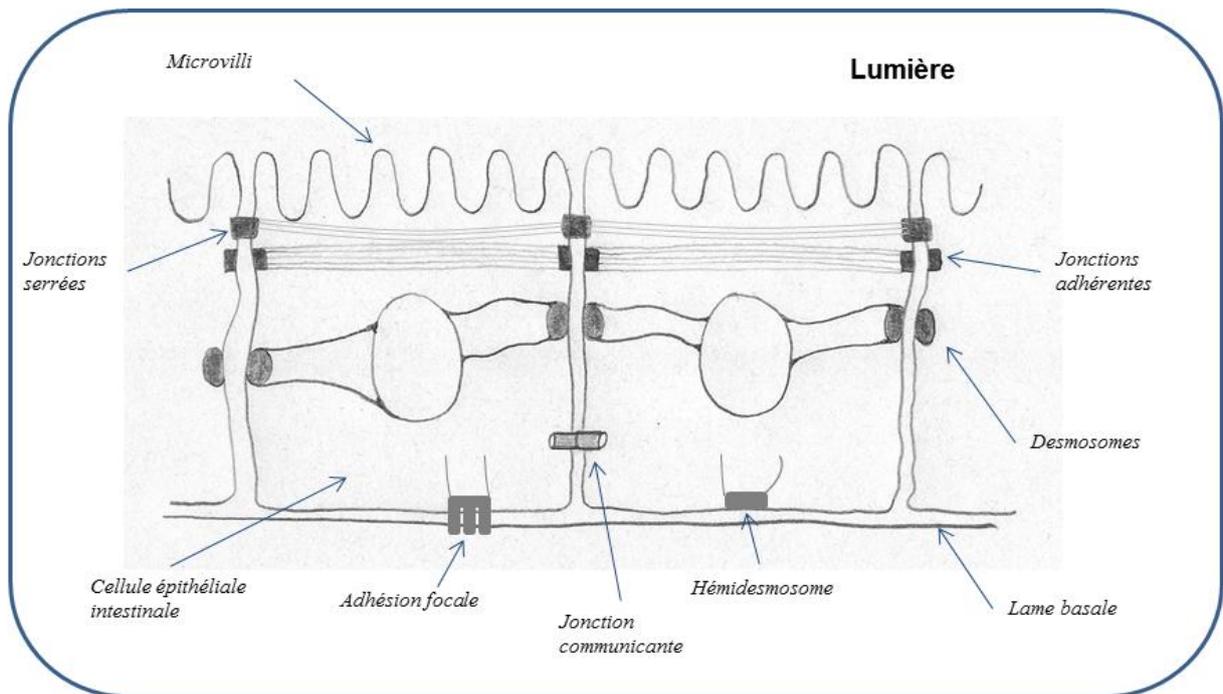
#### **4. Fonctions de la BEI**

Véritable interface entre l'environnement luminal et les tissus sous-jacents, la BEI doit en effet assurer deux fonctions distinctes et complémentaires : d'une part être perméable pour assurer l'absorption de nutriments et d'électrolytes indispensables au métabolisme, et d'autre part, protéger l'organisme contre les agents pathogènes et les toxines. Il s'agit donc bien d'une perméabilité sélective, mettant en jeu des mécanismes de contrôles des flux qui peuvent être assurés par 2 voies : para-cellulaire ou trans-cellulaire. (**Figure 2**).

La perméabilité para-cellulaire est principalement impliquée dans les transferts de molécules de petite taille et contrôle la majorité des échanges. Elle est constituée de complexes moléculaires jonctionnels des CEI qui jouent un rôle également dans la protection contre les agents pathogènes (Madara, 1990). On distingue les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées sont formées par des complexes multi-protéiques associant des protéines transmembranaires et des protéines cytoplasmiques. Les protéines transmembranaires sont constituées par la famille des claudines qui comprend 24 membres, l'occludine et la protéine JAM (Junction AdhesionMolecule). Les protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine par les protéines ZonulaOccludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et la cinguline(Förster, 2008). La taille des pores déterminée par la conformation spatiale des protéines formant les jonctions serrées, contrôle la perméabilité paracellulaire et permet le passage sélectif entre les cellules épithéliales de molécules en fonction de leur taille et de leur charge (Tsukita et al., 2001). Les jonctions adhérentes ou Zonulaadherens relient les cellules entre elles par des interactions homophiles  $Ca^{2+}$ -dépendantes réalisées par la protéine transmembranaire E-Cadherine(Ebnet, 2008; Nieset et al., 1997). Enfin, les desmosomes relient les CEI par leur cytosquelette de filaments intermédiaires de cytokératine. Ils permettent à la BEI de

résister aux forces de tiraillement et de pression (Garrod et al., 2002). Les jonctions communicantes (gap-junctions) permettent aux CEI de communiquer entre elles par des signaux chimiques ou électriques (Prochnow and Dermietzel, 2008).

La perméabilité transcellulaire permet le passage de molécules de poids moléculaire plus élevé, et met en jeu des canaux et transporteurs (assistés ou non) présents dans la membrane cytoplasmique des CEI.



**Figure 2 :** Représentation schématique des différents complexes jonctionnels établis entre les cellules épithéliales et la lame basale. La perméabilité para-cellulaire dépend des jonctions serrées (tight junctions), des jonctions adhérentes (adherens junctions), des jonctions communicantes (gap junctions) et des desmosomes. Les cellules épithéliales développent par ailleurs des complexes jonctionnels avec la lame basale, comme les hémidesmosomes et les adhésions focales.

## 5. Altérations de la BEI au cours de l'inflammation

Un nombre croissant d'études montre que des altérations de la BEI sont impliquées dans la survenue de nombreuses pathologies digestives comme dans les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dans le syndrome de l'intestin irritable (IBS)(Abraham and Cho, 2009) mais aussi dans pathologies extradiigestives (allergies, dermatite atopique, asthme ; diabète de type I ; obésité ; autisme...), Une des lésions de la BEI caractéristique dans la majorité de ces pathologies est une augmentation de sa perméabilité para-cellulaire qui pourrait favoriser le développement d'une réaction inflammatoire. Ce mécanisme est probablement impliqué dans la genèse et l'entretien des MICI, que ce soit la maladie de Crohn et rectocolite ulcéro-hémorragique (inflammation de haut grade), ou bien le syndrome de l'intestin irritable (inflammation de bas grade). En effet, une augmentation de la perméabilité para-cellulaire a été incriminée dans le développement ou la rechute des poussées au cours des MICI (Turner, 2009). On retrouve une augmentation de la perméabilité para-cellulaire favorisant le passage d'antigènes bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) (Abraham and Cho, 2009; Engel and Neurath, 2010). Alors que le LPS déclenche une réponse inflammatoire résolutive normalement chez des patients sains, chez les patients atteints de MICI au contraire, l'existence d'une lésion de la BEI entraîne une réponse exacerbée et non contrôlable. Dans un modèle expérimental de souris IL10<sup>-/-</sup>, on retrouve cette augmentation de la perméabilité para-cellulaire, puis une inflammation digestive (Madsen et al., 1999). Ces altérations de la perméabilité épithéliale entraînent d'un point de vue fonctionnel : d'une part une fuite hydro-électrolytique et protéique vers la lumière digestive à l'origine d'un syndrome diarrhéique et une déperdition protéique ; d'autre part, une perte de la protection à l'égard des antigènes qui par leur taille ne traversent habituellement pas la BEI et qui dans cette situation peuvent la franchir et être à l'origine d'une réponse inflammatoire.

Parmi les molécules impliquées dans les lésions de la BEI, on retrouve des modifications des jonctions serrées. En effet, chez les patients atteints de maladie de Crohn, la discontinuité de la BEI est retrouvée 10 fois plus importante que chez des sujets sains. Elle s'accompagne d'une diminution de l'expression de certaines protéines des jonctions serrées, comme l'occludine, la Claudine 5 et Claudine

8, alors qu'une surexpression de Claudine 2 a été décrite (Zeissig et al., 2007). De plus, ces lésions sont aussi associées à des modifications de certaines voies de signalisation régulant la perméabilité para-cellulaire et la formation des jonctions serrées. Au cours des MICI, il existe une augmentation de l'expression et de l'activité MLCK responsable d'une augmentation de la perméabilité para-cellulaire (Su et al., 2009). La MLCK permet la phosphorylation de MLC qui augmente la perméabilité para-cellulaire en induisant une contraction des fibres d'actine (Blair et al., 2006). L'importance de la régulation de la perméabilité para-cellulaire par la MLCK est renforcée par la corrélation qui existe en clinique entre niveau d'expression MLCK et activité de la maladie de Crohn(Blair et al., 2006).

Dans le syndrome de l'intestin irritable, l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire est également un élément déterminant dans l'expression symptomatique de la maladie. Chez les patients atteints de cette affection, il existe une augmentation significative de la perméabilité de la BEI (Dunlop et al., 2006; Marshall et al., 2004; Matricon et al., 2012; Piche et al., 2009). Reconnue comme une maladie inflammatoire de bas grade, il existe une corrélation entre l'intensité des symptômes ressentis par les patients, et le niveau d'augmentation de la perméabilité para-cellulaire (Camilleri, 2012; Camilleri et al., 2012). Des modèles expérimentaux de stress chronique conduits notamment chez le rat par privation maternelle (Barreau et al., 2004, 2008), ou privation hydrique (Söderholm et al., 2002; Zareie et al., 2006) ont permis de reproduire les lésions de la BEI proches de celles rencontrées dans le syndrome d'intestin irritable, en particulier avec une augmentation de la perméabilité para-cellulaire. L'implication d'une réponse immunitaire médiée particulièrement par les mastocytes pourrait expliquer l'entretien des lésions(Söderholm et al., 2002).

Ces données soulignent le rôle de l'altération de la BEI et particulièrement de la perméabilité para-cellulaire dans la physiopathologie des maladies inflammatoires (MICI et IBS). C'est la raison pour laquelle, dans ce contexte, le renforcement de la BEI et de ses capacités réparatrices représente une nouvelle cible thérapeutique pour ces pathologies. Ainsi plusieurs études dont le modèle de souris IL-10<sup>-/-</sup> ont démontré qu'un renforcement de la BEI pouvait (Arrieta et al., 2009) limiter le processus inflammatoire. Dans cette étude, chez des souris IL-10<sup>-/-</sup>, un traitement par AT-1001 (inhibiteur peptidique de la zonuline) permet de diminuer la perméabilité, et la colite. D'autres molécules ont

ainsi pu montrer un effet bénéfique sur l'inflammation par diminution de la perméabilité paracellulaire. Parmi elles, le polyéthylène glycol(Videla et al., 2007) ou bien la rebamipide(Laharie et al., 2007)ou bien l'infliximab(Cury et al., 2008).

### **III. Innervation intrinsèque de l'intestin : Le système nerveux entérique (SNE)**

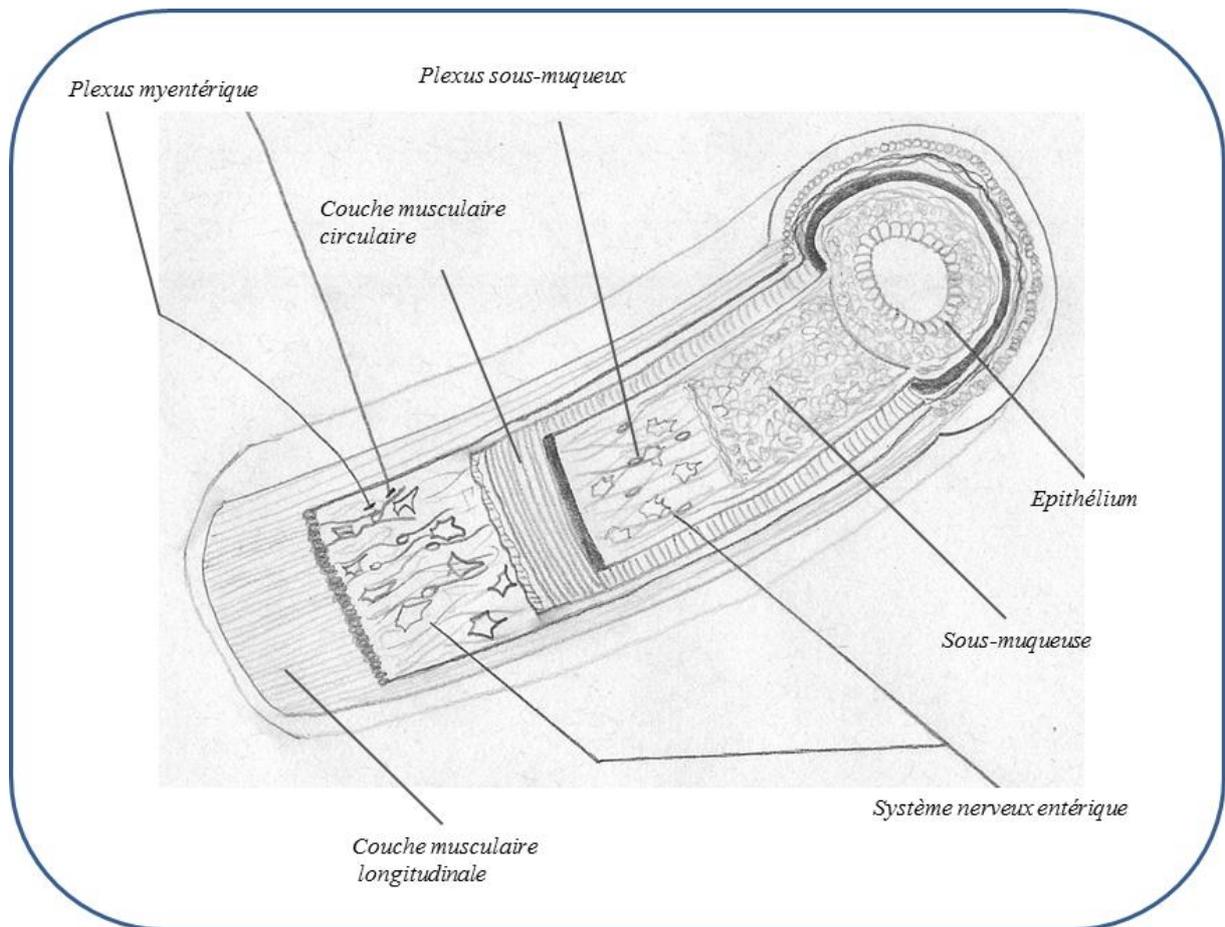
#### **1. Développement du SNE**

Au cours du développement embryonnaire l'innervation intrinsèque et extrinsèque de l'intestin provient de cellules précurseurs des segments vagal, sacré et rostro-troncal de la crête neurale (Burns et al., 2009). La plupart des cellules du SNE proviennent du segment vagal. Les cellules issues du segment sacré vont coloniser la partie post-ombilicale du tube digestif, celles du segment rostro-troncal la partie antérieure de l'intestin primitif (œsophage et estomac supérieur)(Gershon, 1997).

Depuis la crête neurale, les cellules précurseurs vont migrer pour coloniser progressivement l'ensemble de l'intestin à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme et s'achève à 7 semaines (Heanue and Pachnis, 2007). Au cours du développement, c'est l'intervention successive de différents facteurs et de leurs récepteurs qui permet la différenciation entre neurones et cellules gliales. Un de ces facteurs est le GDNF qui précède le front de migration des cellules issues de la crête neurale (Natarajan et al., 2002). Entre autres facteurs rapportés, Mash 1 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des neurones sérotoninergiques(Blaugrund et al., 1996) ; Sox 10 dans la différenciation des cellules gliales entériques (Kelsh, 2006). Migration et différenciation n'interviennent pas successivement mais de façon concomitante et se superposent, il est ainsi possible d'identifier la présence de marqueurs neuronaux tels que la sérotonine à un stade précoce au cours du développement alors que la colonisation n'est pas achevée(Burns et al., 2004).

#### **2. Anatomie descriptive du SNE**

Le SNE est un système nerveux intégratif constitué de plus de 100 millions de neurones et de 2-10 fois plus de cellules gliales entériques (CGE) présents sur l'ensemble du tractus digestif. Il est organisé en deux principaux plexus ganglionnaires : le plexus myentérique dont les constituants régulent principalement la motricité, en particulier le péristaltisme intestinal et le plexus sous-muqueux dont les constituants sont impliqués dans le contrôle des fonctions de la BEI (Neunlist et al., 2012; Schemann and Neunlist, 2004) (**Figure 3**). Le plexus myentérique se trouve anatomiquement entre les couches musculaires longitudinale et circulaire de la paroi intestinale, le plexus sous-muqueux est quant à lui localisé dans la sous-muqueuse. Le nombre de plexus sous-muqueux varie en fonction des espèces : 1 chez les rongeurs (rat, souris, cobaye), 2 chez le porc et trois principaux chez l'homme.



**Figure 3:** Représentation schématique d'une coupe d'intestin, avec ses différentes couches. Le système nerveux entérique est localisé à deux niveaux: entre les couches musculaires longitudinale externe et circulaire interne, le plexus sous-muqueux est situé dans la sous-muqueuse, au contact de l'épithélium de la muqueuse.

### **3. Composants du SNE**

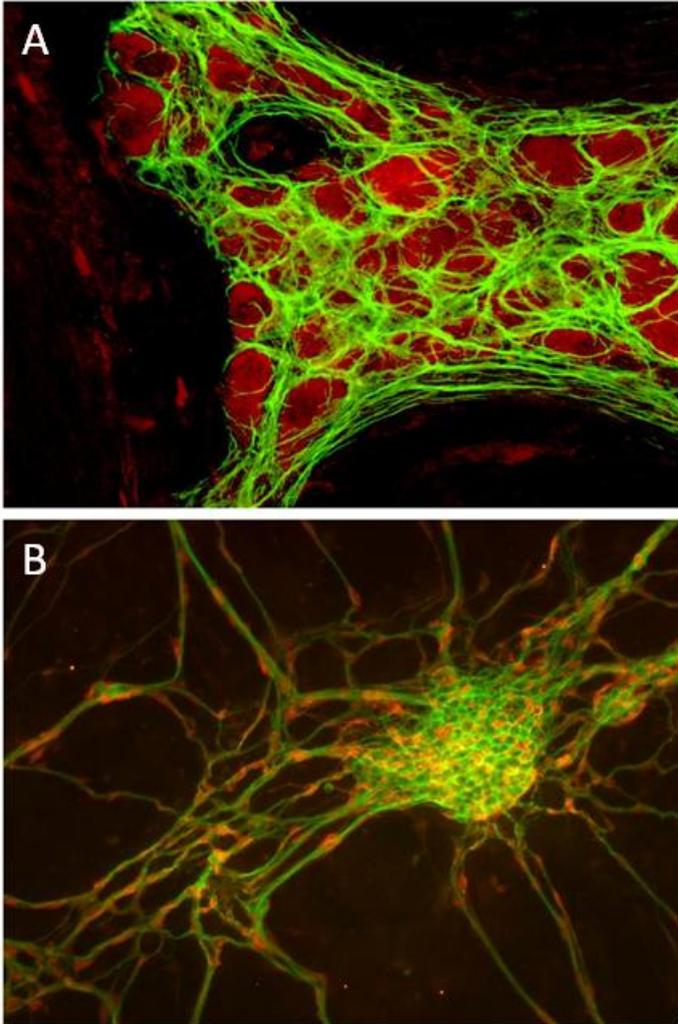
#### **3.1 Les neurones**

Il existe différents types de neurones composant le SNE. Ils peuvent être classés selon leur morphologie, en suivant la classification de Dogiel, la plupart étant classés de type 1 à 7 au sein de l'intestin (Furness, 2000). D'un point de vue électro-physiologique, on distingue schématiquement 2 types de neurones : les neurones S (synaptique) qui correspond à des neurones recevant des signaux d'autres neurones par les synapses qu'ils ont ensemble, et les neurones AH (After Hyperpolarisation) qui se caractérisent par un potentiel d'action suivi d'une hyperpolarisation tardive pendant laquelle l'excitabilité du neurone est réduite (Furness, 2000). A ces différences électro-physiologiques correspondent des fonctions différentes : les neurones AH étant plutôt sensitifs, et les neurones S plutôt interneurones ou neurones moteurs. Néanmoins cette classification a récemment été remise en question en montrant la capacité des neurones S à répondre directement à des stimuli mécaniques (Mazzuoli and Schemann, 2012).

Par ailleurs, les neurones peuvent se distinguer par la nature des neuromédiateurs qu'ils synthétisent. Au sein du SNE, plus d'une trentaine de neuromédiateurs ont été répertoriés, avec parfois plusieurs transmetteurs dans un même neurone (jusqu'à 11) (Schemann and Neunlist, 2004). Les neurones entériques contiennent ainsi de nombreux neuromédiateurs impliqués dans le contrôle des fonctions neuronales et ciblant aussi les constituants cellulaires du tube digestif (cellules musculaires, cellules épithéliales, cellules immunitaires). Parmi les principaux neuromédiateurs synthétisés par les neurones du système nerveux entérique, on retrouve l'acétylcholine (ACh), le vasoactive intestinal peptide (VIP) et l'adénosine triphosphate (ATP), le monoxyde d'azote (NO), la substance P.

### 3.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales sont 4 à 10 fois plus nombreuses que les neurones (**Figure 4**). Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques tels que la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Jessen and Mirsky, 1980) et S100 $\beta$  (Ferri et al., 1982; Jessen and Mirsky, 1983). Ces propriétés morphologiques et phénotypiques sont similaires à celles des astrocytes du SNC. Elles sont reliées entre elles par des jonctions communicantes (Maudlej and Hanani, 1992). Ces cellules interviennent dans la survie des neurones, ainsi que dans la régulation des fonctions neuronales (De Giorgio et al., 2012). En effet, dans certains modèles expérimentaux d'ablation des CGE il existe une neuro-dégénérescence (Bush et al., 1998). D'autre part, les effets neuroprotecteurs directs des CGE ont été identifiés in vitro. Il a ainsi été montré que les CGE protégeaient les neurones entériques de la mort induite par le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou dopamine) via la libération de médiateurs tels que le glutathion ou la 15dPGJ<sub>2</sub>. De plus, les CGE assurent aussi la survie des neurones en les approvisionnant en nutriments. Elles sont ainsi riches en granules de glycogène (Cook and Burnstock, 1976) et représentent la seule source de L-Arginine pour les neurones (Nagahama et al., 2001), nécessaire à la synthèse du NO dans le SNE. De plus, les cellules gliales produisent des facteurs neurotrophiques comme le GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) (Bär et al., 1997). Enfin, des études récentes suggèrent que les cellules gliales pourraient conserver une capacité de cellules progénitrices et se différencier dans certaines situations pathologiques en neurones (Laranjeira et al., 2011).

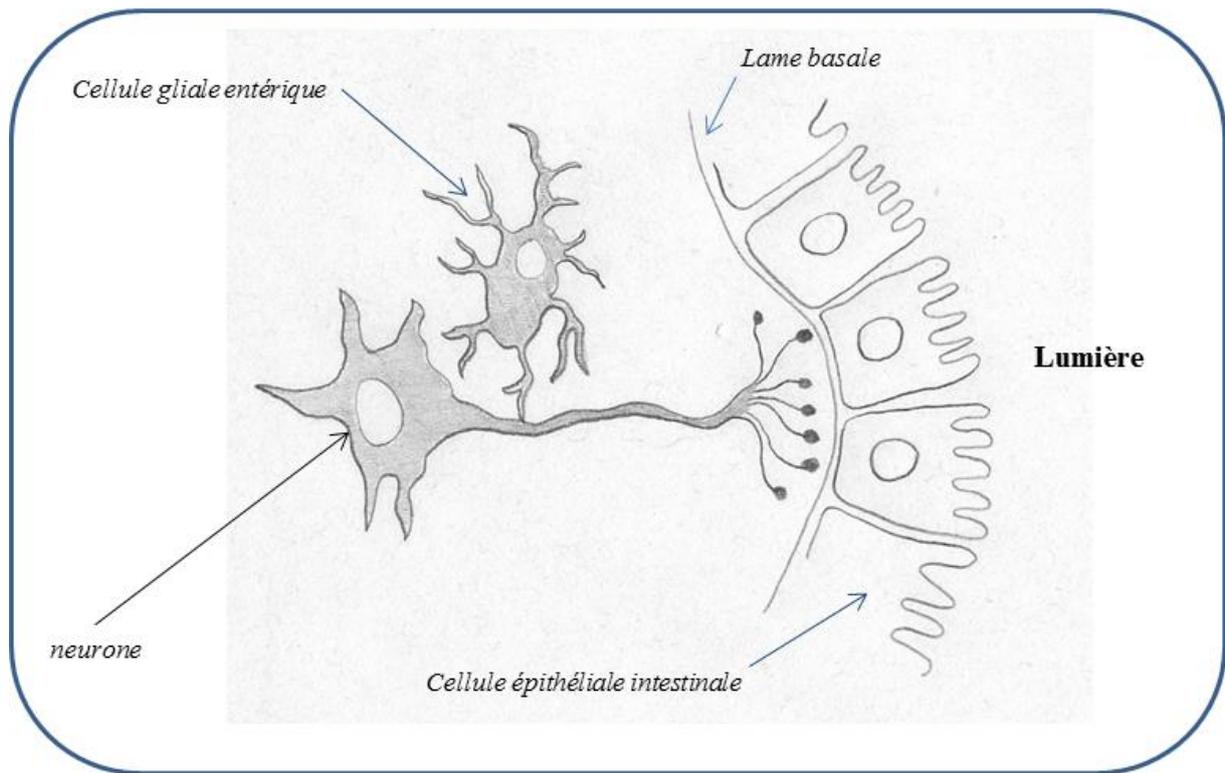


**Figure 4 :** Marquage immuno-histochimique montrant le système nerveux entérique et ses composants: (A) système nerveux entérique de souris en double marquage, glial GFAP (vert) et neuronal HU (rouge) ; (B) culture primaire de système nerveux entérique isolé à partir de l'intestin d'embryon de rat en double marquage, glial (S100 $\beta$ , orange) et structures ganglionnaires ( $\beta$ -tubuline 3,vert).INSERM U913

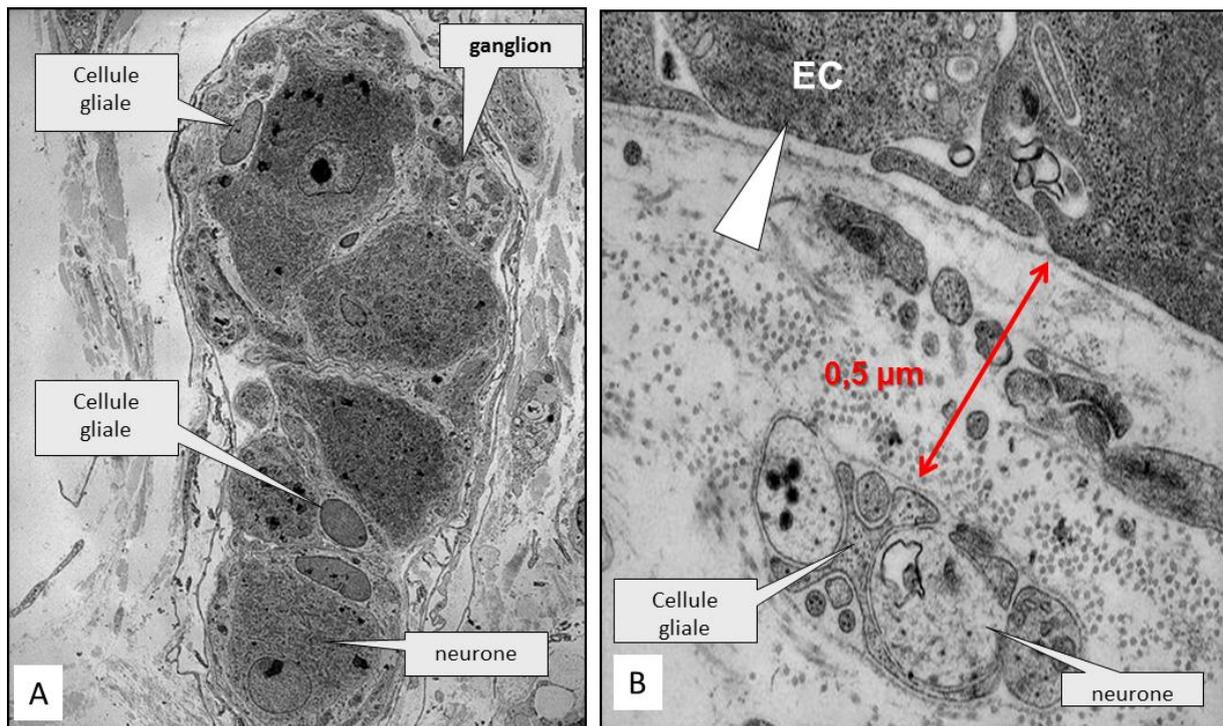
## **4. Contrôle des fonctions digestives par le SNE**

### **4.1 Influence du SNE sur la BEI**

Au sein de la paroi intestinale et tout au long du tractus digestif, neurones, CGE et CEI forment un complexe en étroite relation dans la régulation des fonctions de la BEI que l'on peut regrouper sous le terme générique d'unité neuro-glio-épithéliale (**Figure 5**). Ce terme est basé sur l'existence d'une proximité extrêmement étroite et dense entre les CEI et les fibres du SNE les innervant constituées de terminaisons neuronales et de processus gliaux localisés à moins de 1 $\mu$ m de la BEI (**Figure 6**). D'autre part, l'existence d'une population de CGE dont les corps cellulaires sont présents à l'interface immédiat de la BEI a été suggérée (Neunlist et al., 2012).



**Figure 5:** Schéma de l'unité neuro-glio-épithéliale. Situé sous la lame basale de l'épithélium intestinal, le plexus sous-muqueux comprend les neurones entériques et les cellules gliales qui les accompagnent. Le contact est donc très étroit entre cellules gliales, neurones entériques et épithélium, les échanges neuro-chimiques sont permanents, faisant de ces population cellulaires, une unité fonctionnelle.



**Figure 6 :** Coupes en microscopie électronique montrant un ganglion du plexus sous-muqueux et la proximité entre cellules gliales et neurones (A). Coupe montrant la proximité du rapport entre les ganglions du plexus sous-muqueux et la lame basale de l'épithélium intestinal (B) EC:epithelial cell.. Cette distance est inférieure à  $1\mu\text{m}$  (clichés T. Wedel)

Le SNE influence le fonctionnement de la muqueuse et en particulier de la BEI en modifiant la perméabilité para-cellulaire, en modulant la prolifération cellulaire de l'épithélium, ou encore en contrôlant la sécrétion de mucus par l'épithélium, mais aussi en contrôlant le flux sanguin dans la région sous muqueuse. Dans cette action, les deux composantes du SNE sont impliquées : les neurones et la glie.

#### **4.1.1 Implication du SNE dans la régulation de la perméabilité para-cellulaire**

Un nombre croissant d'études a permis d'identifier le SNE comme un régulateur clé responsable du maintien des fonctions de la BEI et en particulier la perméabilité para-cellulaire. Il a ainsi été démontré dans un modèle de co-culture composé de sous-muqueuse humaine et d'une monocouche de CEI (clone HT-29 16<sup>E</sup>) que la stimulation électrique des neurone sous-muqueux diminuait la perméabilité de la monocouche et augmentait de façon concomitante l'expression de l'ARNm et de la protéine ZO-1 (Neunlist et al., 2003a). Cette étude a aussi identifié le VIP comme un médiateur responsable des effets constatés. En effet, le VIP était responsable d'une augmentation de l'expression de ZO-1 et les effets de la neurostimulation sur la perméabilité et l'expression de ZO-1 bloqués par un antagoniste du VIP. Inversement aux effets du VIP, d'autres neuromédiateurs libérés par le SNE tel que l'Ach, augmente la perméabilité para-cellulaire (Cameron and Perdue, 2007)(Saunders et al., 1997). En particulier, l'augmentation de perméabilité para-cellulaire induite par le stress était médiée par l'acétylcholine, et bloquée après injection d'atropine. En parallèle à ses effets sur la perméabilité para-cellulaire, l'acétylcholine peut aussi augmenter la perméabilité transcellulaire(Cameron and Perdue, 2007).

Concernant les CGE, elles entretiennent aussi de fortes interactions avec les cellules de la BEI. Des preuves issues d'études in vivo et in vitro étayent ces hypothèses. D'une part, la délétion des CGE induit une augmentation de la perméabilité intestinale qui précède le développement d'une inflammation intestinale (Bush et al., 1998). La délétion plus modérée des CGE est aussi associée à une augmentation de la perméabilité para-cellulaire in vivo. Néanmoins, l'utilisation d'un

gliotoxique(fluorocitrate) n'a pas permis d'identifier de modifications de la perméabilité para-cellulaire. Les effets directs des CGE sur la perméabilité ont été caractérisés à l'aide de modèles de co-culture de CEI en présence de CGE. Ces modèles ont permis de montrer que les CGE diminuent la perméabilité para-cellulaire in vitro et que ces effets sont associés avec une augmentation de l'expression de la protéine ZO-1 dans les CEI. Ces effets semblent médiés en partie par la libération de GSNO (S-nitrosoglutathione) par les CGE (Savidge et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs facteurs sécrétés par les cellules gliales peuvent avoir une influence sur la perméabilité para-cellulaire. Ainsi, le S100 $\beta$  diminue la perméabilité para-cellulaire de biopsies coliques humaines (Neunlist et al., 2008). Par ailleurs, les CGE sont capables de sécréter l'IL-6 (Rühl et al., 2001) qui diminue la perméabilité para-cellulaire.

#### **4.1.2 Implication du SNE dans la prolifération des cellules épithéliales**

L'implication du SNE dans la prolifération des CEI a été suggérée par une étude visant à caractériser les mécanismes impliqués dans les effets trophiques du GLP-2 (Glucagon-like peptide 2). Ces travaux ont montré que le GLP-2 induisait la différenciation de cellules progénitrices et était associée à l'induction par le GLP-2 c-Fos dans le SNE mais également au niveau de l'épithélium, principalement au niveau des cryptes, ces effets étant bloqués par l'administration d'agent bloquant l'activation neuronale(Bjerknes and Cheng, 2001). Des travaux plus récents suggèrent que les cellules souches intestinales ou progénitrices pouvaient être régulées par les neurones cholinergiques, et qu'elles présentaient des récepteurs muscariniques à la surface membranaire (M3 et M5) (Lundgren et al., 2011).

Par ailleurs, les effets directs du SNE sur la prolifération des CEI a été mis en évidence dans un modèle de co-culture de sous muqueuse humaine avec des CEI (HT29 clone16E). Il a été montré que l'activation électrique des neurones diminuait la prolifération des cellules épithéliales intestinales par une voie VIPergique(Toumi et al., 2003). L'effet direct des neuromédiateurs a aussi été étudié : la somatostatine semble être impliquée car ses antagonistes entraînent un blocage de la prolifération

cellulaire in vivo (Castell et al., 2001). Par ailleurs, l'ATP et l'ADP augmentent la prolifération des cellules intestinales (Dignass et al., 1998) et VIP et PACAP diminuent la prolifération des lignées cellulaires coliques (Lelièvre et al., 1998; Toumi et al., 2003).

Les CGE peuvent aussi moduler fortement la prolifération des CEI. En effet, l'ablation in vivo des CGE conduit à une hyperprolifération des CEI et une dysplasie des cryptes (Neunlist et al., 2007). D'autre part, des modèles de co-cultures ont permis de mettre en évidence les effets directs anti-prolifératifs de CGE médiés en partie par la libération de TGF-B1 (Neunlist et al., 2007), ou 15dPGJ2 (Bach-Ngohou et al., 2010). Par ailleurs, le GDNF possède des propriétés anti-apoptotiques dans les lignées coliques HT-29 et SW480 lors de l'induction par le TRAIL (Tumornecrosis factor related apoptosis inducing ligand) (Steinkamp et al., 2003) qui pourraient participer aux effets des CGE sur la régulation de la prolifération.

#### **4.1.3 Autres implications du SNE dans le fonctionnement de la BEI : sécrétions hydro-électrolytiques et vascularisation sous-muqueuse**

Outre ses effets sur la régulation des fonctions de la BEI, le SNE est aussi impliqué dans le réflexe vasodilatateur des vaisseaux de la sous muqueuse. L'ensemble du flux sanguin intestinal est en effet sous influence combinée du système nerveux extrinsèque sympathique (issu des ganglions coeliaque et mésentérique) et du SNE essentiellement dans sa composante sous-muqueuse (Galligan et al., 1990; Jiang and Surprenant, 1992). L'innervation intrinsèque de la paroi des artérioles de la sous-muqueuse de l'intestin grêle de cobaye est essentiellement sous la dépendance de récepteurs cholinergiques muscariniques. Ainsi l'activation des récepteurs M3 par l'ACh induit la libération de NO et une vasodilatation artériolaire (Andriantsitohaina and Surprenant, 1992). En plus de cette voie cholinergique, une composante impliquant VIP et Substance P a été identifiée dans le côlon (Vanner and Surprenant, 1991).

Enfin, les neurones entériques peuvent moduler la sécrétion de mucus à la surface de l'épithélium par la libération de neuromédiateurs comme de VIP et l'ACh (Plaisancié et al., 1998). De façon

concomitante, il existe une voie de stimulation des neurones sécréto-moteurs, par l'activation des voies sensorielles lors de la distension mécanique de la BEI. Ces neurones sécréto-moteurs sont polarisés au sein de la paroi digestive et différenciés en neurones ascendants cholinergiques (Neunlist and Schemann, 1998) et des neurones descendants VIPergiques. Enfin, Arginine et Glutamine régulent de façon positive la prolifération, la migration et la survie des cellules épithéliales et ont aussi des effets bénéfiques sur la réparation de la BEI (Marc Rhoads and Wu, 2009).

#### **4.1.4 Modifications du SNE en situation inflammatoire avec modification de la perméabilité para-cellulaire**

Au vu du rôle physiologique clé joué par le SNE dans le contrôle des fonctions de la BEI, il est devenu de plus en plus clair que des pathologies associées à des dysfonctions de la BEI présentent aussi des lésions du SNE. D'une manière générale, il reste à déterminer si ces lésions sont la cause des dysfonctions de la BEI ou une conséquence de la pathologie, en particulier de l'inflammation. (Esposito et al., 2007; Wedel et al., 1998).

Les lésions du SNE observées au cours de pathologies sont souvent dénommées neuropathies entériques (De Giorgio et al., 2012). Elles sont caractérisées par l'association d'une ou plusieurs lésions : des modifications du comportement électrophysiologique, du contenu en neuromédiateurs ou des altérations morphologiques (processus dégénératifs). Cette partie ne vise pas à faire une revue exhaustive des lésions du SNE observée au cours des pathologies digestives mais plutôt d'illustrer les principales altérations observées dans les maladies inflammatoires de l'intestin.

Ainsi au cours des MICI, au cours de la maladie de Crohn, un épaississement des nerfs de la sous-muqueuse mais également au niveau du plexus myentérique a été observé (Geboes and Collins, 1998). L'hyperplasie nerveuse existe pour la maladie de Crohn ainsi que la recto-colite hémorragique, mais paraît plus profonde pour la maladie de Crohn (Lindgren et al., 1993). D'autre part, une perte neuronale a été rapportée dans des modèles animaux de MICI (colites au TNBS). Le mécanisme de perte

neuronale serait lié à une apoptose, et serait bloqué par administration d'un serum anti-neutrophile (Boyer et al., 2005).

D'autre part, des modifications de l'excitabilité neuronale ont été observées dans modèles animaux de MICI. Le comportement électro-physiologique des neurones au cours de l'inflammation se traduit par des modifications rapides de la libération de neuromédiateurs. Ainsi dans un modèle de colite induite par le TNBS, Linden et al. (Linden et al., 2003) ont montré une hyperexcitabilité des neurones du plexus myentérique. Dans ce même modèle les neurones sous-muqueux sont également hyperexcitables et la transmission facilitée par un mécanisme pré-synaptique impliquant 5HT (hydroxytryptamine) du côté postsynaptique(Lomax et al., 2005). En outre, de nombreuses modifications du contenu neurochimique des neurones entériques ont été rapportées dans les MICI. Ces modifications concernent à la fois les zones inflammatoires et les zones distantes de l'inflammation. En particulier, au cours de la MC on observe une augmentation de la proportion de neurones VIP-immunoreactifs sans modification de celle des neurones CHAT ou SP-Immunoréactifs(Schneider et al., 2001). En revanche, au cours de la rectocolite hémorragique (RCH), on observe une augmentation de la proportion des neurones SP-Immunoréactifs sans modifications de la proportion des neurones VIP ou ChAT-Immunoréactifs(Neunlist et al., 2003b).

Les cellules gliales sont aussi affectées au cours des MICI. Ainsi, une atteinte différente de l'expression de marqueurs gliaux est observée dans la maladie de Crohn et la RCH. Ainsi, par rapport à des sujets contrôles, dans la MC, on observe une diminution d'expression de GFAP et S100 $\beta$  dans les zones non inflammatoires mais pas de modifications dans les zones inflammatoires. Inversement dans la RCH, on observe une augmentation de l'expression de GFAP/S100 $\beta$  dans les zones inflammatoires mais pas dans les zones non inflammatoires(Cirillo et al., 2009). Ces lésions des CGE ont aussi été rapportées dans d'autres pathologies inflammatoires comme l'entérocolite nécrosante du nourrisson où une diminution des cellules gliales adjacentes aux neurones a été observée (Wedel et al., 1998). En plus des modifications de l'expression de marqueurs gliaux, Von Boyen et al ont également mis en évidence qu'il existait une augmentation de l'expression des molécules glio-actives telles que le GDNF (molécules marqueurs de l'activation des cellules gliales entériques) chez les patients atteints

de RCHen poussée mais pas chez les patients atteints de maladie de Crohn. Néanmoins, le rôle de cette activation des cellules gliales entériques n'est pas complètement élucidé (Von Boyen et al., 2011). Parallèlement, l'inflammation intestinale est aussi associée en général à une prolifération des CGE (Bradley et al., 1997; Neunlist et al., 2012).

#### **4.2 Effet du SNE dans la régulation de la motricité digestive**

Un rôle primordial du SNE est d'être responsable de la propulsion du bol alimentaire au long du tractus digestif. Depuis l'œsophage jusqu'à l'anus, le SNE est présent et coordonne le péristaltisme intestinal. Selon la région concernée, cette activité est soumise au contrôle plus au moins important ou prépondérant du système nerveux central, via le système nerveux autonome (parasymphatique et sympathique). Ainsi, l'œsophage est soumis à un contrôle de sa contraction par les nerfs vagues, si bien qu'une interruption brutale de cette activité se traduit par l'absence de contraction de l'œsophage (Furness, 2012). Cette activité répond à un mécanisme reflexe interne à la paroi intestinale, dans laquelle un stimulus endo-luminal responsable d'une distension mécanique (distension de la lumière par le bol alimentaire) entraîne la libération de sérotonine par les cellules entérochromaffines de l'épithélium intestinal. Il s'ensuit une activation des neurones sensitifs intrinsèques, les IPAN (Intrinsic Primary Afferent Neurons) (Furness et al., 1998; Kirchgessner et al., 1992) Ces neurones présentent une morphologie de Dogiel type II et un comportement électro-physiologique de type AH (Furness, 2000). Ils sont sensibles à 3 types de stimuli : les modifications chimiques, les distensions intestinales et les distorsions mécaniques de la muqueuse (Furness et al., 1999). Ils sont connectés entre eux sur toute la circonférence et tout le long du tube digestif afin de coordonner l'activité motrice (Furness et al., 1998).

Les IPAN sont en connexion avec les interneurones ascendants et descendants dont l'axone se projette respectivement vers le versant proximal et le versant distal de l'intestin. Il existe une seule classe d'interneurones ascendants, immuno-réactifs pour la ChAT, la SP et la calretinine (Brookes et al., 1997). La transmission entre les interneurones ascendants est médiée par l'Ach, en se fixant sur des

récepteurs nicotiques (nAChR). La transmission vers les neurones excitateurs est assurée par l'Ach et les Tachykinines (récepteurs NK3)(Bornstein et al., 2004). Sur le versant distal, il existe plusieurs types d'interneurones descendants : le type ChAT/NOS/VIP impliqués dans le réflexe péristaltique ; le type ChAT/SOM est impliqué dans la propagation des complexes myo-électriques migrants dans l'intestin grêle(Furness, 2000). Les transmissions émises par les interneurones descendants vers les neurones moteurs inhibiteurs sont médiées par l'ATP, et peu par l'ACH(Furness, 2000).

Les derniers acteurs neuronaux du péristaltisme sont les neurones moteurs ascendants et descendants. Ces neurones ont une morphologie Dogiel de type I, et un comportement électro-physiologique 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 et al., 1996). Les neurones moteurs excitateurs contiennent des neuromédiateurs multiples, l'ACh, les tachykinines, la substance P, la neurokinine A et l'enkephaline. Ils possèdent des projections longues et courtes. Leur activation entraîne une dépolarisation et une contraction du muscle, bloquée par l'adjonction d'antagonistes aux récepteurs à l'Ach et aux tachykinines. A contrario, l'activation des neurones inhibiteurs induit une hyperpolarisation et une relaxation musculaire, médiée par l'ATP, le NO, le VIP(Hansen, 2003).

Enfin, les cellules interstitielles de Cajal jouent aussi un rôle dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire. Elles se situent dans l'espace intermusculaire, au niveau du plexus myentérique, entre la couche musculuse circulaire et longitudinale(Ward et al., 2004). Leur fonction est de générer des ondes lentes de propagation de la motricité intestinale, induisant un effet « pacemaker ». Elles sont en effet en contact étroit avec les neurones moteurs entériques et sont capables de réagir à différents neurotransmetteurs. Il semble que l'essentiel de la transmission nerveuse motrice implique des connections entre neurones et cellules de Cajal plus qu'entre neurones eux-mêmes.

#### **IV. Innervation extrinsèque de l'intestin : le système nerveux autonome sympathique et parasympathique**

Même si le SNE est un système intégratif, autonome, et qu'il intervient directement sur le fonctionnement à la fois de la barrière épithéliale et de la motricité digestive, il reste néanmoins soumis à la double influence des systèmes nerveux autonomes antagonistes sympathique et parasympathique.

##### **1. Développement de l'innervation sympathique et parasympathique de l'intestin**

C'est également de la crête neurale que l'innervation extrinsèque du tube digestif va progressivement coloniser l'intestin. Les cellules précurseurs totipotentes issues de la région crâniale et sacrée vont former les noyaux centraux des fibres parasympathiques qui vont migrer progressivement vers l'intestin proximal par l'intermédiaire du nerf vague, et l'intestin caudal par les fibres présacrées. Dans ce processus, le GDNF semble tenir une place importante pour favoriser le développement des neurones (Enomoto et al., 2000). De façon récente, le gène TBX-1 (22q11) par ailleurs à l'origine en cas de délétion du syndrome de Di-George chez l'homme, a été impliqué dans le développement du nerf vague (Calmont et al., 2011). En effet, chez les souris mutées pour ce gène, il existe un déficit sévère de l'innervation gastrique par le nerf vague. Parallèlement, le système sympathique se met en place depuis les noyaux tronculaires de la crête neurale. Les fibres issues de ces noyaux sont plus courtes, et forment une synapse précoce au niveau de la chaîne latéro-vertébrale. Les facteurs influençant différenciation des neurones selon leur phénotype neurochimique (cholinergique, adrénérgique ou non adrénérgique non cholinergique) restent encore partiellement connus, mais pourraient dépendre de l'environnement extracellulaire au niveau des organes cibles eux-mêmes. (Apostolova and Dechant, 2009; Davies, 2009).

Cette migration et différenciation de l'innervation extrinsèque de l'intestin s'effectue à la même période et parallèlement à la mise en place du SNE, et les facteurs impliqués sont souvent similaires (GDNF). Pour autant, le développement peut être dissocié, comme dans le modèle TBX-1  $-/-$ , où le SNE est normal alors que le développement parasymphatique vagal est déficient (Calmont et al., 2011). Les facteurs neurotrophiqes impliqués dans le développement des 2 systèmes sont encore très partiellement connus (Young et al., 2004).

Le système sympathique est présent tout au long du rachis thoraco-lombaire, la chaîne vertébrale étant le relais des neurones pré et post-ganglionnaire. Il constitue un véritable réseau suivant les axes vasculaires pour gagner la paroi intestinale et assurer un tonus sympathique noradrénergique inhibiteur du péristaltisme et excitateur au niveau des sphincters pour freiner la progression du transit (Lomax et al., 2010; Shafik et al., 2003).

A l'inverse, le système parasymphatique est réparti uniquement en 2 régions : cervicale (Nerf vague X<sup>ième</sup> paire de nerfs crâniens) assurant l'innervation de la partie initiale du tractus digestif (jusqu'à la partie droite du côlon) et pré-sacrée où il rejoint les lames sacro-recto-génito-pubiennes et assure une innervation de la partie distale du côlon, du rectum et de l'anus (WOODBURNE, 1956). Il a pour sa part cette fois un rôle excitateur du péristaltisme et inhibiteur du tonus sphinctérien (Shafik et al., 2002; Tong et al., 2010). Les deux systèmes ont des effets inverses, représentant une véritable balance entre pro-kinétique et freinateur.

## **2. Système nerveux sympathique et parasymphatique : description anatomique**

Contrairement aux fibres du système somatique, le système nerveux végétatif se caractérise par la présence de 2 neurones disposés en série : le neurone pré-ganglionnaire dont le corps cellulaire se trouve dans le système nerveux central, et le neurone post-ganglionnaire dont le corps est localisé dans les ganglions végétatifs. On distingue le système nerveux sympathique et parasymphatique qui diffèrent par :

- L'origine du neurone pré-ganglionnaire (moelle thoraco-lombaire pour le sympathique et tronc cérébral et moelle sacrée pour le parasympathique)
- La position du relais entre les 2 neurones par rapport aux organes innervés (par la chaîne latéro-vertébrale à distance des viscères innervés pour le système sympathique et à proximité immédiate des organes pour le système parasympathique)
- La nature des neuromédiateurs entre neurone post-ganglionnaire et effecteur (noradrénaline pour le système sympathique et acétylcholine pour le système parasympathique)

## **2.1 Voies efférentes des systèmes sympathique et parasympathique (Figure 7)**

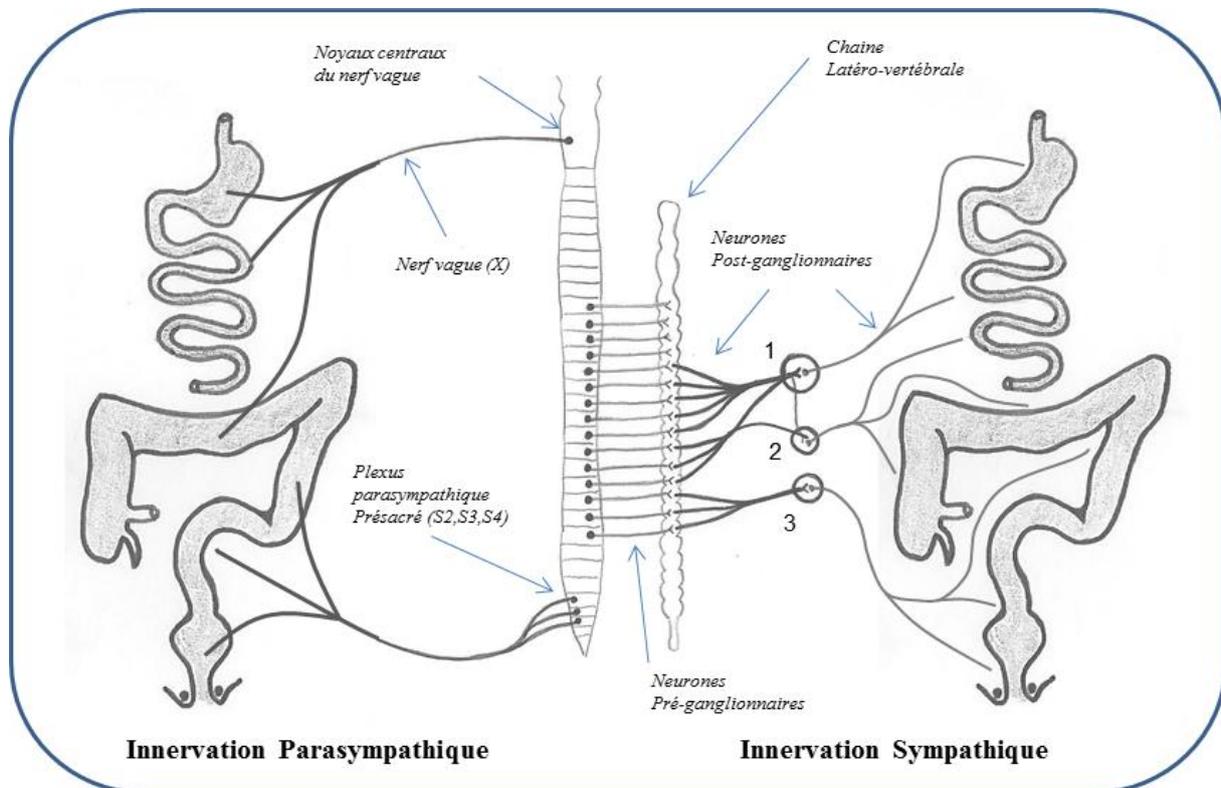
Concernant le système sympathique, les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires se situent dans la corne intermedio-latérale de la moelle épinière depuis l'étage thoracique, jusqu'au niveau lombaire. Ces fibres myélinisées quittent la moelle par les racines antérieures, puis empruntent les rameaux communicants blancs, pour établir une synapse dans les ganglions de la chaîne para-vertébrale. Certaines fibres sont plus longues et traversent les ganglions de la chaîne para-vertébrale pour rejoindre des ganglions plus périphériques (coeliaque, mésentérique supérieur ou mésentérique inférieur). Les fibres post-ganglionnaires sont amyéliniques, elles rejoignent les viscères depuis les ganglions périphériques (para-vertébraux ou coelio-mésentériques). Le ganglion coeliaque innerve ainsi l'estomac et les reins, le ganglion mésentérique supérieur l'intestin grêle et le ganglion mésentérique inférieur le côlon.

Concernant le système parasympathique, les fibres pré-ganglionnaires sont en général amyéliniques. Elles naissent principalement en deux noyaux du système nerveux central : d'une part la colonne viscéro-motrice des nerfs crâniens (le noyau d'Edinger-Westphal (III) / Le noyau lacrymal et salivaire (VII), le noyau salivaire inférieur (IX) / le noyau cardio-pneumo-entérique (X)) ; d'autre part, le noyau végétatif de la colonne intermedio-latérale de la moelle sacrée (S2 à S4). La majorité des fibres destinées à l'appareil digestif sont contenues dans le nerf vague (X<sup>ième</sup> paire des nerfs crâniens). Elles font synapse avec les neurones post-ganglionnaires directement à proximité des organes innervés. A

l'étage abdominal, œsophage, estomac, intestin grêle, partie proximale du côlon (jusqu'au transverse gauche), foie avec la vésicule biliaire et pancréas sont innervés par les nerfs vagues.

## **2.2 Voies afférentes des systèmes sympathique et parasympathique**

Les voies afférentes sont principalement non myélinisées. Les afférences vagales qui assurent l'innervation sensitive de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et la partie proximale du côlon représentent environ 80% des fibres parasympathiques. Leurs corps cellulaires sont situés dans le ganglion plexiforme à proximité du bulbe. Leurs extrémités distales se trouvent au niveau du tronc cérébral dans les noyaux du tractus solitaire ou elles s'articulent avec les voies efférentes. Des afférences splanchniques ou spinales assurent l'innervation sensitive de l'ensemble des viscères abdominaux par des fibres sympathiques, mais également des organes pelviens notamment la partie distale du côlon, le rectum et l'anus par des fibres parasympathiques. Leurs corps cellulaires sont situés dans les ganglions spinaux. Leurs extrémités distales sont situées dans la corne postérieure de la moelle épinière.



**Figure 7 :** Schéma de l'innervation extrinsèque parasymphatique et sympathique de l'appareil digestif. Concernant le **système parasymphatique**, les noyaux centraux se situent à 2 endroits, au niveau du tronc cérébral (nerf vague) et au niveau de la moelle sacrée. Le neurone pré-ganglionnaire issu de ces noyaux centraux est long, le neurone post-ganglionnaire se situe dans la paroi des viscères innervés. Le territoire d'innervation du nerf vague concerne la partie proximale de l'appareil digestif, jusqu'au côlon transverse droit. Les fibres issues du plexus pré-sacré innervent la partie distale du côlon, descendant, sigmoïde et rectum. Concernant le **système sympathique**, le neurone pré-ganglionnaire est court, issu de la moelle épinière thoraco-lombaire, il fait relais au niveau de la chaîne latéro-vertébrale. Les neurones post-ganglionnaires sont plus longs, avec des relais formant notamment des ganglions coeliaque (1), mésentérique supérieur (2) et mésentérique inférieur (3) qui assurent respectivement l'innervation de la partie proximale de l'appareil digestif (œsophage, estomac jusqu'au jéjunum), la partie médiane (intestin grêle et portion initiale du côlon) et distale (côlon descendant, sigmoïde et rectum).

### **3. Influences du système sympathique et parasympathique sur les fonctions digestives :**

A tous les étages du tube digestif, le système nerveux autonome exerce une influence sur l'innervation intrinsèque du tube digestif. Il peut donc ainsi moduler la motricité digestive, mais également les fonctions de la barrière épithéliale intestinale, et enfin avoir des propriétés immuno-modulatrices.

#### **3.1 Sur la motricité digestive**

L'influence respective du tonus sympathique et de la stimulation parasympathique sur la motricité intestinale a pu être évaluée en situation physiologique, mais surtout dans des modèles de pathologies digestives. Le système sympathique exerce globalement un rôle inhibiteur sur la motricité (Lomax et al., 2010; Shafik et al., 2003) sauf au niveau sphinctérien où il favorise la contraction. Dans le syndrome de l'intestin irritable par exemple, le niveau de stimulation sympathique est diminué chez les patients dont le symptôme dominant est la diarrhée (Aggarwal et al., 1994). Cependant, le tonus sympathique s'étendant au-delà de l'effet propre sur les cellules musculaires intestinales, et notamment sur la répartition du flux vasculaire splanchnique, les conséquences d'une stimulation sympathique ne se limitent pas au seul rôle freinateur sur le transit. Concernant les symptômes digestifs liés à l'activité sportive, Ter Steege et coll. ont montré l'importance de l'ischémie splanchnique par hyperstimulation sympathique lors de l'activité physique (Ter Steege and Kolkman, 2012). Les neuromédiateurs du système sympathique sont multiples, au niveau pré-ganglionnaire, l'acétylcholine est le médiateur majoritaire. La plupart des fibres post-ganglionnaires sympathiques sont adrénériques. La dopamine est synthétisée à partir de la tyrosine située dans la terminaison de ces fibres avant d'être transportée dans les vésicules synaptiques. Elle est alors transformée en noradrénaline, puis libérée et recaptée ou dégradée par les enzymes Mono-amine-oxydase (MAO) et Catechol-o-methyl-transferase (COMT). Il existe 2 types de récepteurs adrénériques :

- les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques, qui peuvent être responsables d'une stimulation de la contraction des fibres musculaires lisses ( $\alpha_1$ ) ou bien réduire la libération de neurotransmetteurs sur les neurones pré et post-synaptiques ( $\alpha_2$ ).
- Les récepteurs  $\beta$  adrénergiques retrouvés principalement au niveau cardiaque et au niveau des bronches et des vaisseaux sanguins. Leur action est essentiellement inotrope et chronotrope ( $\beta_1$ ) et vasodilatateur ( $\beta_2$ ).

Concernant le système parasympathique, la majorité des études s'est concentrée sur les effets du nerf vague au vu de l'étendue de son innervation sur la majorité du tractus digestif depuis l'estomac jusqu'au côlon transverse. Le parasympathique exerce globalement un effet favorisant la contraction des fibres musculaires lisses intestinales, et donc prokinétique sur la motricité digestive. Le neuromédiateur principal est l'acétylcholine. Sa synthèse se fait depuis la terminaison des fibres, avant d'être transportée dans des vésicules synaptiques, libérée puis dégradée par l'acétylcholinestérase. Tous les neurones pré-ganglionnaires sont cholinergiques. Tous les neurones post-ganglionnaires du système parasympathique, et seuls quelques neurones post-ganglionnaires du système sympathique sont cholinergiques. Les récepteurs à l'acétylcholine sont de 2 types : nicotinique (caractérisant la synapse entre neurones pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires) et muscarinique. Ces derniers présentent plusieurs sous-types. L'expression respective de chacun de ces sous-types est spécifique à chaque tissu. Au niveau de l'appareil digestif, au sein du muscle lisse les récepteurs sont de type M3. Ils sont responsables d'une stimulation de la contraction des cellules musculaires. Au sein des glandes exocrines, les récepteurs sont également de type M3, leur activation entraîne une stimulation de la sécrétion. Les modèles expérimentaux de vagotomie en particulier ont permis de bien décrire l'influence du nerf vague sur la motricité digestive. Ainsi, une vagotomie entraîne une diminution des complexes moteurs migrants au niveau de l'estomac, mais son action au niveau de l'intestin grêle semble moins complète. D'autres phénomènes de régulation se surajoutent à ce niveau. L'effet de l'innervation parasympathique véhiculée par le nerf vague semble ainsi maximal sur la partie initiale du tractus digestif (Deloose et al., 2012).

### 3.2 Effets sur la perméabilité para-cellulaire et l'inflammation

A côté de ses effets sur la motricité digestive, la balance sympathique / parasympathique joue probablement aussi un rôle immuno-modulateur sur l'appareil digestif. Ainsi, une stimulation du nerf vague peut exercer des effets anti-inflammatoires (Olofsson et al., 2012). Ce rôle anti-inflammatoire du nerf vagues'effectue à plusieurs niveaux, mettant en jeu les fibres afférentes et efferentes (Bonaz et al., 2013a). Les afférences vagales stimulent d'abord l'axe neuro-endocrine corticotrope (*corticotrophin releasing factor, CRF*) entraînant une sécrétion de cortisol par les glandes surrénales. En effet, la production périphérique de cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ) est capable de stimuler les voies afférences vagales (Dantzer et al., 2000) qui vont entraîner une libération de *CRF*, et de cortisol. Il a ainsi été montré qu'une administration d'IL1 $\beta$  et de lipopolysaccharides entraînait la production d'une activation neuronale (c-fos) au niveau du noyau du tractus solitaire, lieu de terminaison des fibres vagales afférentes (Ericsson et al., 1994). Parallèlement aux afférences, les efférences vagales peuvent également exercer une action anti-inflammatoire. Cette activité anti-inflammatoire se fait directement par les fibres nerveuses périphériques, via la libération d'acétylcholine capable d'inhiber la sécrétion des cytokines inflammatoires (Tracey, 2007). En effet, plusieurs cellules immunitaires comme les macrophages et plusieurs sous-populations lymphocytaires expriment des récepteurs à l'acétylcholine. En particulier la sous-unité  $\alpha 7nAChR$  a pu être identifiée comme prenant une part active dans la transmission de l'activité anti-inflammatoire, en bloquant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Galvis et al., 2006). Parallèlement, il semble que la stimulation du nerf vague ait une action inhibitrice sur la synthèse et l'expression du TNF $\alpha$  par les macrophages situés dans la rate. Elle bloque également la migration et la prolifération des populations lymphocytaires à ce niveau (Bonaz et al., 2013b; Huston et al., 2006; Rosas-Ballina et al., 2011). Cette activité ciblée au niveau splénique passerait par une activation conjointe du sympathique et du parasympathique, particulièrement du nerf splénique issu du ganglion coeliaque. Ces propriétés anti-inflammatoires spécifiques des efférences vagales ont bien été montrées dans un modèle de choc septique (Borovikova et al., 2000). Dans cette étude portant chez le rat soumis à l'injection létale d'endotoxine, La stimulation électrique du nerf vague distal après vagotomie a protégé les animaux contre le développement d'un état de choc.

D'autres études ont exploré ce rôle anti-inflammatoire systémique du vague au tube digestif. Ainsi, l'activation du vague diminue l'iléus post-opératoire via son action anti-inflammatoire (Lubbers et al., 2010). En effet, par son action sur les récepteurs nicotiques exprimés par les macrophages, l'activation du nerf vague permet de prévenir l'inhibition de la motricité intestinale et donc de diminuer l'iléus post-opératoire.

Les effets bénéfiques périphériques de la stimulation vagale ont été démontrés dans d'autres modèles de maladies inflammatoires intestinales, en particulier les MICI. Ainsi, dans des modèles de colites induites après administration de TNBS, la vagotomie aggrave le développement des colites et la sévérité des rechutes (Ghia et al., 2006). De façon complémentaire, des données récentes ont montré que la stimulation vagale prévenait les lésions de la BEI induites dans un modèle de brûlure corporelle. Cet effet semblait mettre en jeu le SNE et plus particulièrement les CGE comme effecteurs finaux de la stimulation vagale agissant sur la BEI (Costantini et al., 2010). Cette voie cholinergique anti-inflammatoire est médiée par le récepteur  $\alpha 7$  nicotinique. Une étude récente a démontré de façon complémentaire que l'adjonction d'un agoniste du récepteur  $\alpha 7$  nicotinique pouvait prévenir les effets délétères sur la barrière des brûlures (Costantini et al., 2012).

Actuellement, il existe donc une littérature scientifique abondante en faveur d'un effet anti-inflammatoire de la stimulation parasympathique depuis sa description (Bonaz, 2007; Borovikova et al., 2000) dans des modèles de pathologies digestives comme la pancréatite ou d'iléus postopératoire (The et al., 2007; van Westerloo et al., 2006). Cependant si l'effet a bien été démontré in vitro et dans des modèles animaux, il n'a pas encore été véritablement démontré en pratique clinique. La stimulation du nerf vague est néanmoins déjà utilisée notamment dans les pathologies cérébrales comme la dépression ou l'épilepsie.

#### **4. Particularités de l'innervation autonome du pelvis**

Les organes pelviens (vessie, rectum, utérus ou prostate et vésicules séminales) reçoivent une innervation végétative mixte issue à la fois du système nerveux sympathique et parasympathique (De

Groat and Krier, 1978)(**Figure 8**). Le périnée reçoit quant à lui une innervation somatique sensitive et motrice, véhiculée par les racines sacrées puis les nerfs pudendaux et clunéaux inférieurs.

Le système sympathique forme une chaîne pré et para-vertébrale continue (par des rameaux communicants) qui parcourent le rachis thoraco-lombaire. Elle se poursuit au niveau sacré le long de sa corticale interne, jusqu'au niveau pré-coccygien où elle s'achève par le ganglion Impar. Plus haut, en regard des vertèbres lombaires et des gros vaisseaux, se forme le plexus pré-aortique qui se densifie sous forme de ganglions en regard des vaisseaux mésentériques supérieur et inférieur. Ce plexus se prolonge vers le bas à hauteur de la bifurcation aortique, et forme le plexus hypogastrique inférieur. Ce dernier est à l'origine des nerfs hypogastriques, qui cheminent sous le promontoire, le long des faces latérales du pelvis, et viennent s'épanouir en plexus latéralement, au-dessus du plan des muscles *levatorani* formant les lames sacro-recto-génito-pubiennes. Tout au long de ce trajet, les nerfs hypogastriques reçoivent des connexions avec les neurones issus des chaînes ganglionnaires pré et latéro-vertébrales.

Le système parasympathique est issu du plexus pré-sacré, principalement développé aux dépens des racines sacrées S3, mais aussi S2 et S4. Il n'y a pas de chaîne ganglionnaire, le premier neurone est long, gagnant directement les plexus dans les lames sacro-recto-génito-pubiennes par l'intermédiaire des nerfs érecteurs.

Ces plexus latéraux (lames sacro-recto-génito-pubiennes) sont donc des structures indifférenciées recevant des connexions neuronales issues des systèmes sympathique et parasympathique, point de départ de l'innervation des organes pelviens (détrusor, sphincter vésical, musculature rectale et sphincter interne de l'anus) pouvant selon la nature du stimulus, véhiculer un tonus sympathique adrénérgique, ou bien un message parasympathique prédominant.

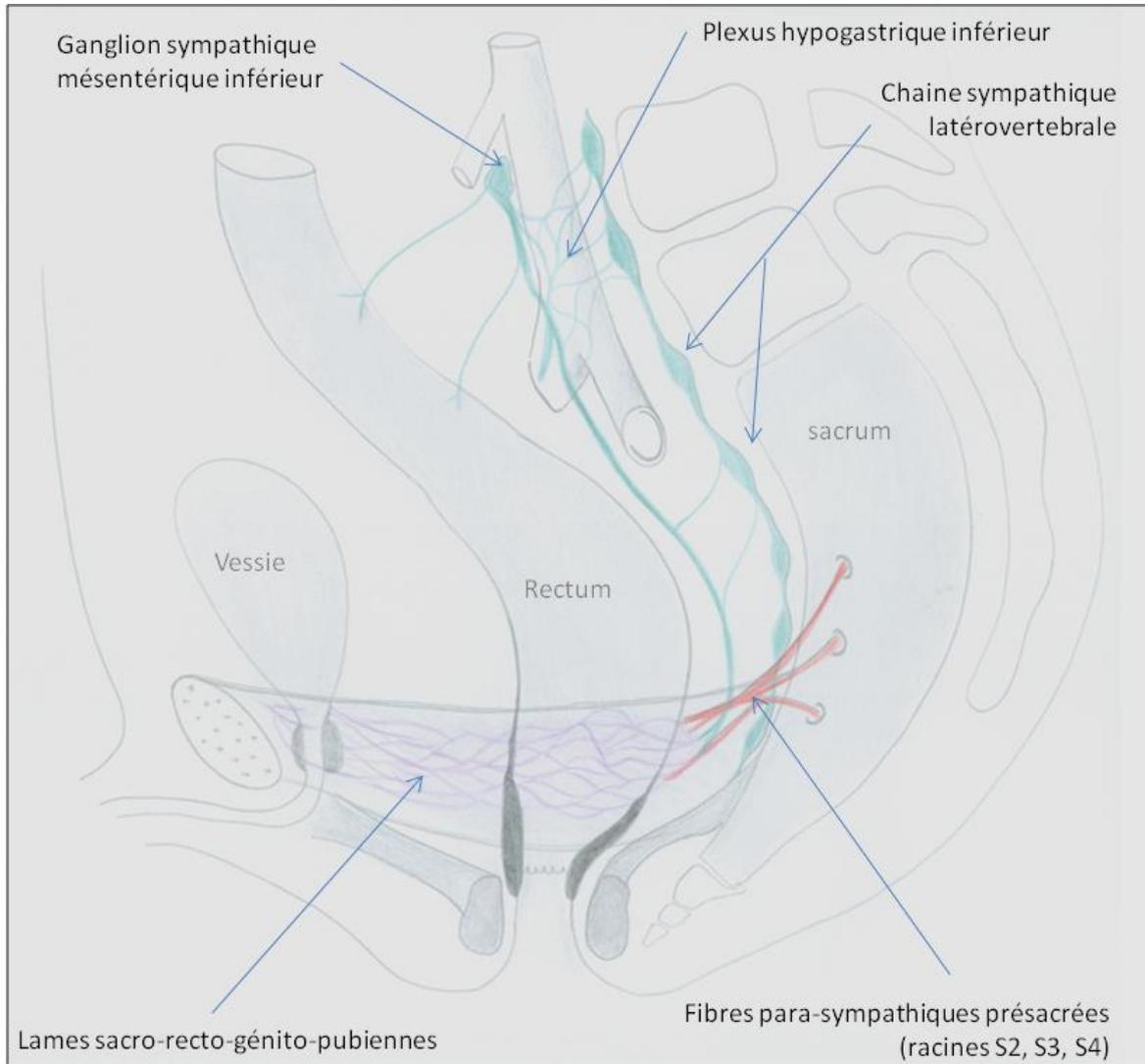
L'innervation périnéale, somatique intervient également dans le fonctionnement des organes pelviens et en particulier le sphincter externe de l'anus. Le nerf pudental véhicule en effet des fibres motrices destinées au sphincter externe strié de l'anus, sous commande volontaire, ainsi que des fibres sensibles responsables de la sensibilité périnéale péri-anale.

Pour assurer un fonctionnement normal des organes pelviens, il faut donc faire intervenir des afférences multiples :

- D'une part des fibres neuro-végétatives qui empruntent les fibres sympathiques de façon ascendante via les nerfs hypogastriques et le plexus hypogastrique inférieur, les chaînes ganglionnaires présacrées, mais aussi les fibres parasympathiques des nerfs érecteurs puis les racines sacrées ;
- D'autre part des fibres sensibles somatiques véhiculées par les nerfs pudendaux et les racines sacrées.

En retour, les efférences sont également multiples :

- D'une part les fibres neuro-végétatives issues du plexus hypogastrique inférieur, mais aussi par des rameaux communicants directement des chaînes latéro-vébrales jusqu'au niveau coccygien pour le système sympathique, et par les racines sacrées (S2,S3,S4) et les nerfs érecteurs pour le parasympathique pré-sacré.
- D'autre part, les fibres motrices somatiques, véhiculées par la racine sacrée S3 principalement empruntant le tronc des nerfs pudendaux, venant innerver le sphincter externe de l'an.



**Figure 8 :** Coupe sagittale du pelvis masculin montrant l'organisation de l'innervation extrinsèque des viscères pelviens, incluant le système sympathique avec la chaîne latérovertébrale et le relais formé par le ganglion sympathique mésentérique inférieur et le plexus hypogastrique inférieur ; puis le plexus parasymphatique pré-sacré issu des racines S2,S3,S4. L'ensemble des fibres nerveuses afférentes et efférentes convergent vers les lames sacro-recto-génito-pubiennes qui se répartissent dans un plan sagittal antéropostérieur de part et d'autre des viscères pelviens, assurant leur innervation.

En raison des effets du SNE sur les fonctions digestives à la fois sur la motricité et la BEI, le développement de méthodes de stimulation du SNE représente une nouvelle approche thérapeutique des pathologies digestives. L'existence d'un système nerveux extrinsèque représenté par le sympathique et parasympathique permet d'envisager une stimulation globale ou plus ciblée de l'appareil digestif. Différentes voies de neurostimulation ont ainsi été développées chez l'homme dans la prise en charge des troubles digestifs pour lesquels le SNE est susceptible d'avoir un effet bénéfique, comme dans les lésions de la BEI. Ces procédés de neurostimulations empruntent les connexions neuronales existantes, soit intrinsèques (stimulation directe), soit extrinsèques (stimulation indirecte vagale ou sacrée). Parmi elles, la stimulation des racines sacrées est une voie abordable pour stimuler le côlon distal et le rectum et cibler le SNE et la BEI.

## **V. Neurostimulation digestive chez l'homme**

### **1. Effets de la stimulation directe de la paroi digestive**

La stimulation directe de la paroi gastrique à des fréquences faibles (0-2Hz) chez l'homme entraîne la contraction de l'antrum gastrique. L'augmentation de la fréquence augmente l'amplitude des contractions avec un effet maximal à 2-4Hz, mais ne modifie pas la vitesse de propagation des contractions gastrique. La contraction gastrique ainsi induite accélère sa vidange (Berthoud et al., 2002). Chez les patients souffrant de gastroparésie induite principalement par le diabète et résistante au traitement médical, l'implantation d'un pacemaker gastrique peut être proposée (Tang and Friedenberg, 2011). Celui-ci améliore significativement les symptômes cliniques sur le court et le long terme (Abell et al., 2003). Si le bénéfice clinique est prouvé, cette technique depuis sa description n'a pas vu ses indications augmenter significativement. La complexité de la procédure nécessitant de positionner les électrodes au contact de la paroi gastrique par une intervention explique probablement l'absence de diffusion de cette approche thérapeutique. Enfin, chez les patients obèses, elle permet d'augmenter la vidange gastrique et d'entraîner une perte de poids de 20%(Wang et al., 2006). De façon très récente, cette modalité thérapeutique a été évaluée dans le traitement du reflux gastro-oesophagien avec une influence bénéfique sur le tonus du sphincter inférieur de l'œsophage (Rodríguez et al., 2012) et une amélioration des symptômes moyennant le positionnement d'électrode à l'extrémité inférieure de l'œsophage, à proximité du sphincter inférieur. Les résultats sont prometteurs, mais restent encore à confirmer dans des séries plus conséquentes.

### **2. Effets de la stimulation vagale**

La stimulation vagale a été évaluée chez l'homme mais dans un but de neurostimulation du SNC par le biais des afférences qui rejoignent le tronc cérébral. L'indication est principalement l'épilepsie de l'adulte ou de l'enfant, résistante aux traitements médicaux (Connor et al., 2012). Dans cette

indication, la neurostimulation a pour objectif d'apporter un influx nerveux modulant l'hyperexcitabilité du locus coeruleus impliqué dans la genèse des crises épileptiques en empruntant les afférences vagales jusqu'au noyau du tractus solitaire (Fornai et al., 2011). Ce traitement est reconnu par la FDA (Food and drug administration) aux états-unis depuis la fin des années 90, puis en Europe depuis les années 2000. Il permet une réduction significative des crises épileptiques (50%) avec un suivi de 3 ans (Morris and Mueller, 1999). Des fréquences de stimulation variant de 10 à 30 Hz permettent de limiter les effets secondaires (paresthésies, toux) tout en maintenant une efficacité thérapeutique (Handforth et al., 1998). Actuellement, il n'y a pas d'application clinique en routine de la neurostimulation vagale à visée digestive. Cette approche thérapeutique représente néanmoins une voie de recherche en devenir, principalement pour cibler la voie cholinergique anti-inflammatoire précédemment décrite. Les pathologies ciblées par cette stimulation seraient les maladies inflammatoires intestinales (Syndrome de l'intestin irritable ou MICI) mais également l'iléus postopératoire. Dans cette indication, les conclusions des modèles expérimentaux animaux montrent qu'une stimulation du nerf vague par des stimuli externe comme la mastication ou l'administration d'un mélange riche en lipides en préopératoire peuvent avoir un rôle dans la prévention de l'iléus postopératoire par exemple. Des essais cliniques chez l'homme s'ouvrent actuellement (Berghmans et al., 2012; Lubbers et al., 2010)(Bonaz et al., 2013a).

### **3. La neurostimulation sacrée**

La SRS cible la partie distale de l'intestin (côlon descendant et rectum et anus, ainsi que les autres viscères pelviens); elle représente la principale application de la neurostimulation digestive en pratique clinique.

#### **3.1. Indications de la neurostimulation sacrée**

La SRS est une méthode qui permet l'activation des racines sacrées contenant des fibres nerveuses du système nerveux sympathique et parasympathique et somatique à destinée pelvienne,

notamment rectale et vésicale. Dans le champ des pathologies digestives, il s'agit actuellement de la technique de neurostimulation digestive la plus développée. Ses indications s'étendent progressivement, certaines validées par des études prospectives randomisées comme l'incontinence anale, d'autres en cours d'évaluation comme la constipation chronique ou les syndromes douloureux pelviens chroniques.

### **3.1.1 Historique**

Initialement évalué dans les années 60 puis 70 pour le traitement des troubles de vidange vésicale à la fois pour l'incontinence urinaire, vessie hyperactive et vessie rétentionnelle chez les blessés médullaires avec la volonté de favoriser la contraction du détrusor, la SRS a progressivement montré son efficacité à améliorer la vidange vésicale (BOYCE et al., 1964; Brindley, 1977, 1993). Ce traitement a connu véritablement son essor après sa reconnaissance par la Food and Drug Administration (*FDA*) pour cette indication (1997). Depuis, plus de 25000 patients ont bénéficié dans le monde de ce traitement (Oerlemans and Van Kerrebroeck, 2008). Son application a été étendue au traitement de l'incontinence anale grâce aux travaux de Matzel et al. (Matzel et al., 1995). Dans cette étude princeps, les auteurs rapportent l'amélioration de la continence chez des patients atteints d'incontinence anale par faiblesse sphinctérienne (sans rupture sphinctérienne individualisée) grâce à une neurostimulation sacrée S3. C'est à partir de cette expérience initiale que la neurostimulation a progressivement été proposée aux patients atteints d'incontinence anale.

### **3.1.2 Résultats dans les différentes indications**

#### **3.1.2.1 L'incontinence anale**

L'incontinence anale se définit comme la perte incontrôlée de gaz ou de selles par l'anus. Elle peut être liée à une affection du sphincter lui-même comme dans les ruptures sphinctériennes post-

obstétricales (ou traumatiques), mais également à un défaut de compliance du rectum, à une affection neurologique avec atteinte des nerfs périphériques à destinée rectale et sphinctérienne ou bien une atteinte de la zone sensible au niveau de muqueuse basse du canal anal. Outre le traitement de la cause, lorsqu'il est possible, la prise en charge symptomatique de l'incontinence anale fait appel aux traitements médicaux de première intention, parmi lesquels le loperamide, la diphenoxylate plus atropine (Cheetham et al., 2003). La rééducation notamment par la technique de Biofeedback est un appoint intéressant, mais pour laquelle les études sont à ce jour très limitées (Norton and Cody, 2012). La SRS a donc été proposée comme une alternative mini-invasive, avant d'envisager une stomie de dérivation, ou un sphincter artificiel ou une graciloplastie dynamisée.

Initialement évaluée et proposée à des patients qui avaient un appareil sphinctérien indemne de rupture même modérée, son effet bénéfique sur la continence a été démontré dans des études multicentriques de cohortes. Ainsi en 2004, une première étude multicentrique rapporte une diminution du nombre de fuites hebdomadaires chez les patients implantés qui passent de 16 à 2 en moyenne à un an chez 37 patients implantés (Matzel et al., 2004). Dans une revue des séries publiées jusqu'en 2004, Jarrett confirme ces résultats avec un succès (restitution d'une continence) dans 75% des cas chez les 149 patients colligés (Jarrett et al., 2004). Les résultats montrent un succès comparable des alternatives thérapeutiques plus invasives comme le sphincter anal artificiel (Meurette et al., 2009). Dans cette étude comparative non contrôlée et rétrospective, l'efficacité de la SRS permettait une amélioration de la continence à un niveau inférieur au sphincter artificiel, mais exposait à moins de troubles de la vidange du rectum, donc finalement une qualité de vie comparable. Cette modalité thérapeutique de l'incontinence anale représente désormais une alternative reconnue et validée chez les patients chez qui le traitement conservateur n'a pas permis d'obtenir un confort de vie suffisant (Wexner et al., 2010). À long terme, plus de 60% des patients soumis au test pourront être implantés, et parmi eux, environ la moitié aura un score de continence satisfaisant permettant un bon confort de vie (Wong et al., 2011), même si 20 à 30% auront finalement une efficacité jugée insuffisante de la SRS.

De façon récente, la SRS a été évaluée également chez les patients souffrant d'incontinence anale avec rupture sphinctérienne. En effet, considérée initialement comme une contre-indication, les premières séries excluait les ruptures sphinctériennes des candidats à cette approche thérapeutique. Néanmoins, le caractère multifactoriel du mode d'action à la fois sur le sphincter et le rectum a progressivement amené à envisager de tester les patients porteurs d'une rupture sphinctérienne. Aussi, plusieurs études originales (Boyle et al., 2009; Conaghan and Farouk, 2005; Dudding, 2011; Govaert et al., 2009; Jarrett et al., 2005; Santoro et al., 2012) et une revue de la littérature (Ratto et al., 2012) ont évalué l'efficacité de la SRS chez les patients incontinents anaux présentant une lésion du sphincter anal externe et/ou interne. Toutes ces études concluent que les résultats sont comparables à ceux observés chez les patients sans rupture sphinctérienne. Ces résultats semblent de surcroît indépendants de l'étendue de la lésion sphinctérienne (Boyle et al., 2009; Chan and Tjandra, 2008).

Une autre indication de la SRS serait la pathologie médullaire et neuro-dégénérative avec troubles de la continence. En effet, plusieurs études ont rapporté une amélioration de la continence anale des patients présentant une pathologie neurologique (Gstaltner et al., 2008; Holzer et al., 2007; Jarrett et al., 2005; Rosen et al., 2001). Les patients testés souffraient essentiellement de lésions médullaires incomplètes (lésion traumatique, vasculaire, sclérose en plaques, spina bifida). Après un suivi moyen de 35 mois, Rosen et al. ont rapporté une amélioration significative des troubles de la continence anale chez 28 patients sur 36 testés (78%) (Rosen et al., 2001). L'existence d'une lésion neurologique périphérique ou centrale incomplète à l'origine de l'incontinence anale, pourrait même être un facteur de bon pronostic pour le succès du traitement par SRS (Brouwer and Duthie, 2010; Gourcerol et al., 2007). Il semble néanmoins préférable d'attendre au moins un an entre un épisode neurologique aigu et le test de SRS en cas d'éventuelle récupération spontanée même partielle (Holzer et al., 2007). Un des facteurs limitant actuellement, est la nécessité de réaliser des IRM pour le diagnostic ou l'évolutivité de la pathologie neurologique sous-jacente. Or, la réalisation d'une IRM est actuellement une contre-indication chez les porteurs de stimulateurs des racines sacrées implantés et peut compliquer la prise en charge de ces patients.

Parmi les limites que l'on peut formuler à l'égard de la SRS dans cette indication (pour laquelle l'expérience est la plus avancée), certains auteurs rapportent une diminution de l'efficacité chez certains patients avec le temps. Cette notion, encore peu explorée en raison du caractère récent de la technique, fait encore débat. Ainsi, plusieurs études rapportent des pertes d'efficacité, sans véritables explications (George et al., 2012) de façon inconstante, sans que des facteurs prédictifs ne puissent être avancés (Hollingshead et al., 2011). On peut estimer que 10 à 30% des patients auront une perte d'efficacité et ne poursuivront pas le traitement. L'origine peut être la survenue d'effets secondaires (douleur ou infection) mais aussi une diminution du contrôle de l'incontinence (Maeda et al., 2011a; Wong et al., 2011). Il serait cependant intéressant, pour mieux sélectionner les patients à traiter par cette approche, de définir des facteurs prédictifs de succès pour ce traitement onéreux (Maeda and Laurberg, 2011; Maeda et al., 2011b). Il est actuellement recommandé de proposer l'implantation en cas de réponse au test, en prévenant le patient des résultats plus incertains à long terme.

### **3.1.2.2. Constipation et intestin irritable**

Parmi les patients testés SRS pour incontinence anale, un bénéfice sur le confort digestif avec notamment une diminution des douleurs abdominales, du météorisme est souvent rapporté par les patients. Ce bénéfice subjectif, difficile à quantifier de façon objective a progressivement amené à formuler l'hypothèse d'une action de la SRS sur la motricité colique (Dinning et al., 2007). La neurostimulation sacrée a donc été évaluée en clinique dans la constipation, à la fois par inertie colique et troubles de la vidange rectale.

Concernant l'inertie colique, plusieurs études préliminaires ont montré des résultats encourageants (Kenefick et al., 2002a). Parmi les études rapportées, la principale d'entre elles est une étude prospective multicentrique, ayant inclus 62 patients testés par SRS avec un taux d'implantation après succès du test de 73%, et comme résultat une augmentation de la fréquence des selles hebdomadaire par un facteur 3, une diminution significative de la sensation de vidange incomplète du rectum en fin d'exonération (Kamm et al., 2010). Une revue des séries publiées jusqu'en 2012 a colligé

les résultats de 13 articles. Les chances de succès du test de SRS sont comprises entre 42 et 100%. Une fois implantés de façon définitive, l'amélioration concerne 87% des patients avec un suivi de 2 ans (Thomas et al., 2013). Ces résultats encourageants doivent pourtant être interprétés avec prudence, tant qu'aucune étude prospective randomisée ne permet définitivement de confirmer le bénéfice du traitement dans cette indication. De surcroît, les critères d'inclusion des patients sont assez disparates et incluent constipations de transit authentiques et troubles distaux.

Concernant les troubles de vidange du rectum (constipation terminale), les résultats sont encore plus parcellaires dans la littérature. Cette forme de constipation est rarement individualisée de la constipation de transit. Néanmoins, une étude a évalué l'amélioration des troubles de l'évacuation chez 13 patients qui présentaient un trouble de la sensibilité rectale en manométrie (évaluée par le volume de perception à la distension du ballonnet intra-rectal). Dans cette étude randomisée (période ON et OFF du stimulateur), l'amélioration de la vidange du rectum a été complète sous stimulation pour 11 des 13 patients. Les données manométriques ont également montré une amélioration de la sensibilité du rectum par rapport aux périodes sans stimulation. Après un suivi de 19 mois, 9/13 patients implantés conservent le bénéfice initial du traitement (Knowles et al., 2012).

Le syndrome de l'intestin irritable représente une entité nosologique qui comprend douleurs abdominales et troubles du transit. L'intérêt de la SRS a également pu être évalué. Les résultats préliminaires dans cette indication semblent néanmoins prometteurs. Ainsi, une stimulation temporaire a été testée chez 6 patients souffrant d'un syndrome d'intestin irritable avec succès, et diminution des scores symptômes chez les patients. Dans cette étude pilote, 2 semaines après la stimulation les patients retrouvaient leurs symptômes initiaux, l'effet était donc suspensif (Lundby et al., 2008).

### **3.1.2.3. Syndromes douloureux pelviens chroniques**

Les syndromes douloureux pelviens chroniques incluent de nombreuses entités dont le point commun est l'existence de douleurs évoluant depuis plus de 6 mois. La physiopathogénie est multifactorielle, à la fois d'origine nociceptive, inflammatoire, ou encore ischémique. Il s'associe à ces manifestations douloureuses de façon variable des symptômes fonctionnels urinaires (incontinence,

urgenterie) ou bien digestifs ano-rectaux (incontinence, dyschésie) ou sexuels (dyspareunie). Tenant compte d'un effet souvent global sur l'innervation pelvienne, la SRS a été évaluée dans cette indication, avec des résultats encourageants. Associée à une cystite interstitielle, la douleur pelvienne chronique a pu être traitée efficacement (Caraballo et al., 2001; Peters, 2012; Srivastava, 2012). En cas de douleur ano-rectale prédominante, le bénéfice est également retrouvé (Falletto et al., 2009; Govaert et al., 2010). Par ailleurs, en cas de douleur testiculaire ou vulvo-vestibulaire et clitoridienne chez la femme, la SRS a pu montrer une amélioration (McJunkin et al., 2009)(Marcelissen et al., 2010; Ramsay et al., 2009).

#### **3.1.2.4. Pathologies inflammatoires intestinales**

Les pathologies intestinales inflammatoires chroniques représentaient une contre-indication de la SRS, en raison des risques liés à l'implantation de matériel à des patients dont le risque d'infections est accru (traitement immunosuppresseur), en l'absence d'effet démontré sur la continence. Néanmoins, cette contre-indication a récemment été remise en question dans une étude ayant implanté 5 patients souffrant d'incontinence anale secondaire à une maladie de Crohn, avec lésion ano-périnalesséquellaires. Les auteurs rapportent une amélioration significative de la continence anale des patients après un suivi moyen de 14 mois sans néanmoins déterminer l'impact de la SRS sur l'inflammation digestive (Vitton et al., 2008a). Depuis cette publication, une étude a montré un bénéfice à la neurostimulation chez 11 patients suivis pour une rectocolite hémorragique réfractaire au traitement médical immunosuppresseur. Dans cette étude, les auteurs ont rapporté une diminution de l'inflammation muqueuse évaluée par une modification du dosage de la calprotectine fécale (données non publiées, résumé de congrès UEGW 2011).

### **3.2 Déroulement pratique de la SRS (Figure 9)**

Le traitement comprend en pratique 3 phases :

La première phase correspond au positionnement de l'électrode avec repérage de la meilleure position anatomique. La seconde phase correspond au test chronique de 3 semaines après implantation de l'électrode, pour évaluer l'efficacité thérapeutique sur la continence. La troisième phase correspond à l'implantation définitive du stimulateur en fonction des résultats du test.

### **3.2.1 Mise en place de l'électrode**

Au cours du test, une aiguille de ponction non isolée à son extrémité, est insérée dans les trous sacrés S2 et/ou S3 et/ou S4 gauche et/ou droit par voie percutanée, sous contrôle radioscopique du positionnement. Un stimulateur externe (Medtronic 3625, Interstim) est alors connecté à l'aiguille de ponction de façon à stimuler la racine sacrée testée. L'opérateur choisit la racine sacrée dont la stimulation donne une meilleure réponse motrice périnéale ainsi que sur le fléchisseur de l'hallux homolatéral, c'est-à-dire la réponse motrice la plus ample pour la plus faible intensité de stimulation. Dans la majorité des études, le repérage de la meilleure réponse motrice s'effectue subjectivement, de façon visuelle. Certains utilisent la manométrie anorectale et/ou l'électromyogramme pour quantifier la réponse motrice anale (Matzel et al., 2001), mais l'intérêt de ce repérage, qui alourdit le geste technique n'est pas validé. Il n'existe pas de consensus concernant le repérage de la racine. Certains testent les racines sacrées les unes après les autres en commençant par S3 et s'arrêtent dès qu'ils ont obtenu une bonne réponse motrice (Altomare et al., 2004; Ganio et al., 2001; Gourcerol et al., 2007; Uludağ et al., 2004; Vaizey et al., 1999). D'autres équipes testent systématiquement toutes les positions et choisissent la meilleure à la fin du test (Hetzer et al., 2005; Matzel et al., 1995; Rosen et al., 2001). Parfois, deux électrodes sont laissées en place de façon à tester alternativement, pendant plusieurs jours, lors du test chronique, les deux positions (Dudding et al., 2008). En pratique, la racine sacrée S3 est la racine la plus fréquemment choisie et semble être la plus efficace dans l'expérience des différentes équipes (Dudding et al., 2008; Melenhorst et al., 2008). Le positionnement de l'électrode est effectué sous anesthésie locale et/ou générale en fonction des études. L'anesthésie locale permet de recueillir les sensations du patient et donc de guider, en complément de la réponse

motrice, ou si celle-ci est absente, la position de l'électrode. Trois études soulignent le caractère prédictif de la réponse motrice et/ou sensitive au cours du test aigu, pour le succès du test temporaire (Govaert et al., 2009; Maeda et al., 2011b) ou de l'implantation définitive du stimulateur (Dudding et al., 2008) et recommandent pour cette raison, la réalisation du test sous anesthésie locale. L'anesthésie générale est plus confortable pour le patient, ce qui rend plus facile un test complet de plusieurs racines sacrées. Si une anesthésie générale est effectuée, il faut proscrire la curarisation de la procédure anesthésique, pour ne pas masquer la réponse motrice. Le type d'anesthésie utilisée (i.e; locale ou générale) ne semble pas influencer le succès du test temporaire de neurostimulation (Hetzer et al., 2005). Compte-tenu des complications infectieuses potentielles (Faucheron et al., 2010; Mellgren et al., 2011; Wexner et al., 2010), la plupart des centres utilisent une dose d'antibiotiques pré-opératoire à visée prophylactique, surtout lorsque l'électrode définitive est employée d'emblée pour le test temporaire de SRS.

### **3.2.2 La période de test**

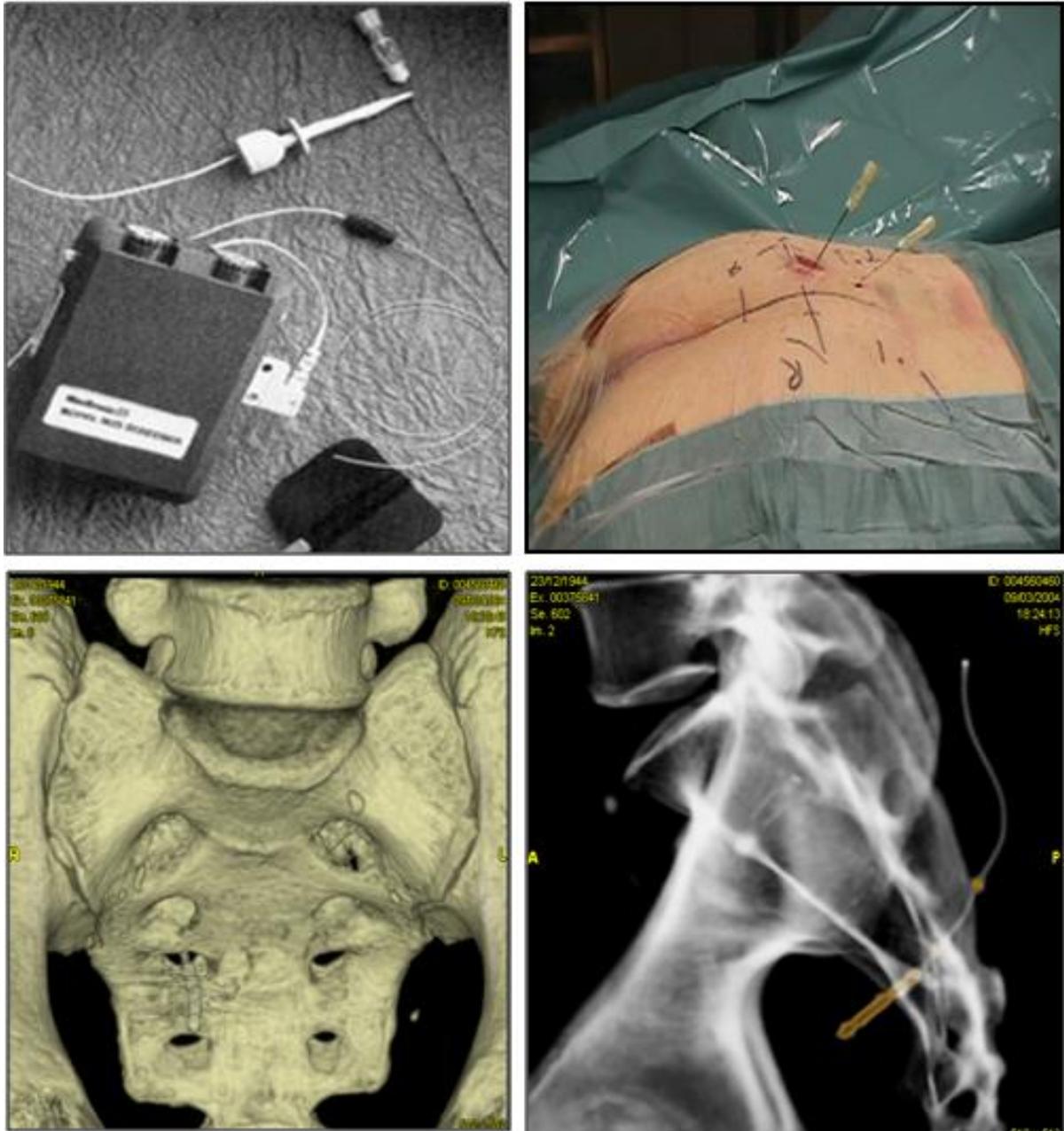
Deux types d'électrodes de test peuvent être utilisés pendant la période de test chronique. La première est une électrode temporaire (Electrode temporaire 3057, Interstim), tunnelisée et fixée à la peau. La seconde est l'électrode définitive, à ailettes, également utilisée au cours de l'implantation définitive du système (*Electrode définitive 3097, Interstim*) (Spinelli et al., 2003). L'électrode permanente permet probablement de maintenir une position de l'électrode soumise à peu de variation grâce aux ailettes qui stabilisent durablement sa position (Altomare et al., 2011; Hetzer et al., 2005; Kessler et al., 2005). Cependant, le retrait de l'électrode définitive en cas d'échec du test chronique, est également douloureux et peut être source de complications (Faucheron and Herault, 2012). Après mise en place du système temporaire, les paramètres de réglage du stimulateur sont standardisés: neurostimulation continue; Fréquence 14Hz; Durée de l'impulsion 210 µsec; Intensité minimale de perception du patient (Kenefick and Christiansen, 2004). La durée du test est variable selon les études, mais, pour les plus récentes, comprise entre 8 jours et 3 semaines. En l'absence de facteurs prédictifs objectifs de l'efficacité de la stimulation, l'évaluation repose uniquement sur des données cliniques rapportées sur un calendrier des selles avant et pendant le test. Sur ce calendrier sont comptabilisés les accidents d'incontinence pour les selles liquides et/ou solides et les besoins impérieux (urgences), et les délais de retenue et les traitements médicamenteux utilisés éventuellement pendant cette période. Le test est positif lorsqu'il existe une diminution des épisodes de fuites (ou d'urgences) d'au moins 50% par rapport à la période avant test. En cas de test positif, l'implantation définitive du stimulateur est alors proposée.

### **3.2.3 Implantation définitive**

L'implantation peut être effectuée sous anesthésie générale ou locale en fonction du type d'électrode utilisée au cours du test (i.e; électrode définitive ou temporaire) et de la tolérance du patient. En cas d'utilisation de l'électrode temporaire, celle-ci est remplacée par une électrode définitive qui sera connectée au stimulateur (Stimulateur 3023, Interstim) par un câble d'extension

tunnelisé (Figure 9). Le stimulateur est implanté en sous-cutané le plus souvent dans la région lombaire, homolatérale à l'électrode de neurostimulation, plus rarement en position abdominale (Mowatt et al., 2007). Les paramètres de stimulation sont identiques à ceux utilisés au cours du test temporaire: continue; Fréquence = 14Hz; durée de l'impulsion = 210 µsec; Intensité = seuil de sensation du patient. Ces paramètres ont été choisis par analogie avec ceux utilisés en urologie. Peu d'études ont évalué l'effet de la variation des paramètres de SRS utilisés sur la continence anale des patients implantés. Koch et al, dans une étude non randomisée, ont conclu que l'efficacité thérapeutique pouvait être obtenue en dessous du seuil de perception(Koch et al., 2005). Une étude prospective randomisée a montré que les patients qui éteignaient leur stimulateur pendant la nuit augmentaient la durée de vie du stimulateur (Michelsen et al., 2008). Toutefois, au cours de cette même étude, 1/3 de ces patients constataient une augmentation de la fréquence des souillures.

Le suivi des patients implantés comprend un calendrier des selles; un score de gravité de l'incontinence anale (Score de la Cleveland Clinic(Jorge and Wexner, 1993)et un score de qualité. Il existe un score de qualité de vie spécifique de l'incontinence anale, traduit et validé en français et donc recommandé(Rockwood et al., 1999; Rullier et al., 2004).



**Figure 9:** Neurostimulation des racines sacrées. Matériel utilisé pour la période de test (A), procédure opératoire d'implantation de l'électrode par voie percutanée au bloc opératoire sous anesthésie locale ou plus souvent générale (B) et contrôle du positionnement de l'électrode tomodynamétrique (C) et radioscopique (D).

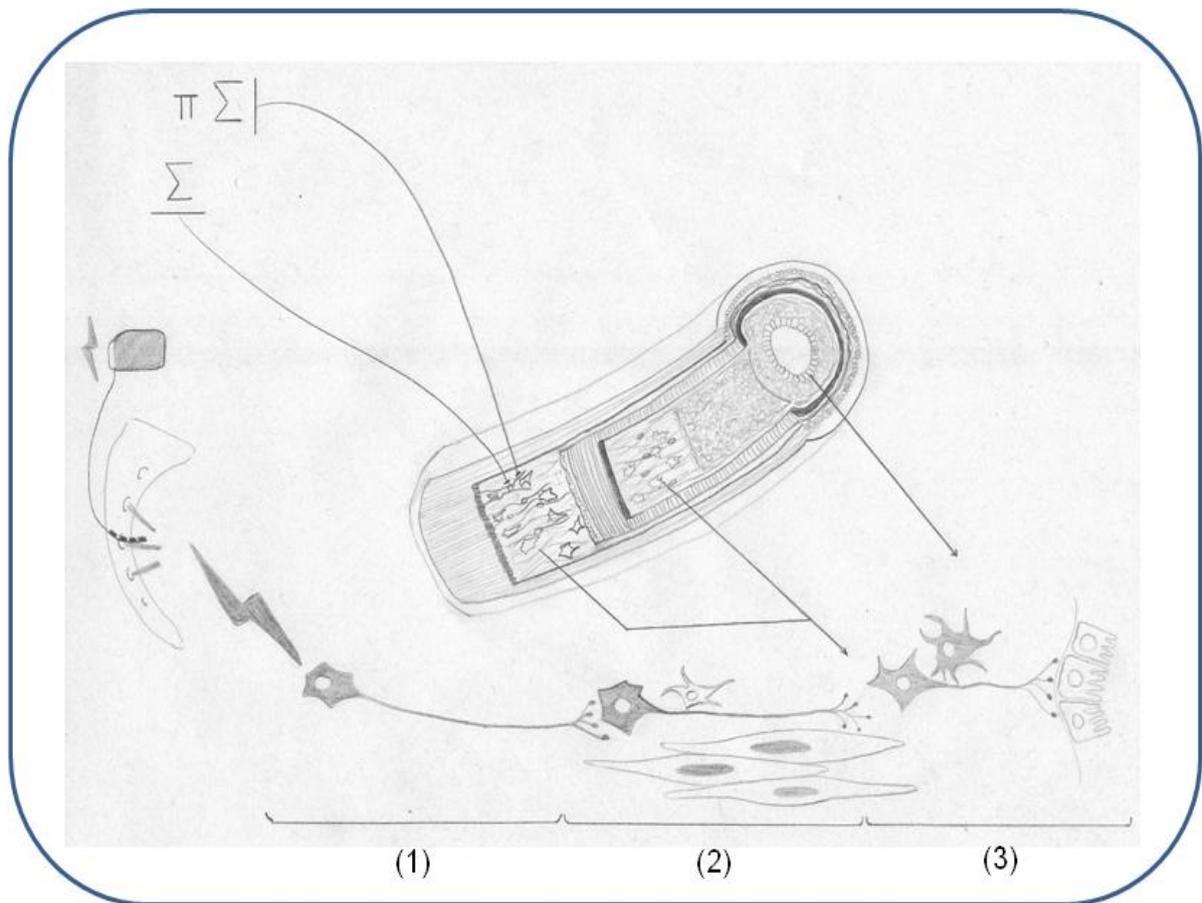
### **3.3 Stimulation bilatérale**

La littérature rapporte de façon quasi exclusive les effets bénéfiques de la SRS unilatérale. Pourtant, l'innervation afférente et efférente du pelvis est latéralisée, avec de façon symétrique une innervation sympathique, parasympathique, et somatique bilatérale. Plusieurs études ont pourtant montré que la SRS bilatérale pouvait avoir un effet plus significatif. Ainsi, chez des patients souffrant de rétention urinaire ou bien d'incontinence, la stimulation bilatérale pourrait être avantageuse (Matzel et al., 2002; Pham et al., 2008).

## **4. Mode d'action de la SRS**

### **4.1 Cibles neuronales potentielles de la stimulation S3**

Lorsqu'on ponctionne le 3<sup>ième</sup> orifice sacré pour stimuler électriquement à proximité de la racine S3, le courant électrique aura la possibilité de stimuler les fibres nerveuses à proximité : les fibres somatiques motrices et sensitives contenues dans la racine S3, à destinée de l'appareil sphinctérien externe et de la peau péri-anale ; les structures situées dans la région autour de la racine S3 qui sont : les neurones du plexus parasympathique pré-sacré (fibres afférentes et efferentes) (Mathis et al., 2002; Vitton et al., 2008b); les neurones des chaînes ganglionnaires sympathiques latéro-vertébrales pré-sacrées en connexion avec les nerfs hypogastriques et le plexus hypogastrique inférieur (fibres également afférentes et efferentes) (**Figure 10**).



**Figure 10:** Représentation schématique de l'activation du système nerveux autonome par la neurostimulation des racines sacrées. La stimulation électrique de la 3<sup>ème</sup> racine sacrée peut exercer une activation des fibres effectrices du système nerveux sympathique par l'intermédiaire de la chaîne ganglionnaire para-vertébrale, mais aussi les fibres effectrices du système nerveux parasympathique pré-sacré. Le neurone postganglionnaire est ainsi stimulé (1); le système nerveux entérique (Les plexi myentériques (2) et sous-muqueux(3)) peut ainsi être ciblé par cette activation. Les effets sur la motricité digestive et sur la barrière épithéliale restent encore à déterminer. L'activation des neurones afférents n'est pas représentée sur ce schéma.

#### **4.2 Hypothèse du mécanisme d'action global de la SRS**

Si l'amélioration clinique des patients incontinents répondeurs au test est incontestable, en revanche le mode d'action et les cibles précises de la SRS sont encore à déterminer. Parmi les mécanismes d'actions possibles, l'effet moteur direct sur les fibres du nerf pudendal destinées à l'appareil sphinctérien anal, et plus largement à la musculature périnéale, a été évoqué initialement. Elle permet donc une augmentation du tonus du sphincter anal (Abdel-Halim et al., 2011). Cette participation purement motrice efférente somatique a été démontrée dans les études avec explorations électro-physiologiques et sert de repère pour le positionnement de l'électrode au moment du test (Fléchisseur propre de l'hallux) et contraction du sphincter externe de l'anus.

Cependant, la composante motrice excitatrice sur le sphincter anal de la SRS ne suffit pas à expliquer son action probablement plus globale sur l'appareil digestif et le système nerveux central. Plusieurs arguments dans la littérature appuient cette hypothèse :

Son efficacité même en cas de lésion sphinctérienne (rupture postobstétricale) étant rapportée par plusieurs équipes, si l'action de la SRS se concentrait uniquement sur l'appareil sphinctérien, son efficacité serait logiquement moindre en cas de sphincter endommagé. Or les résultats sont similaires (Ratto et al., 2012). D'autres études ont aussi montré que la SRS exerçait une action sur la compliance rectale qui pourrait avoir un effet synergique avec l'augmentation des performances sphinctériennes sur la continence anale. Par ailleurs, les études qui ont tenté de standardiser les effets de la SRS sur le sphincter ont rapporté des résultats variables. Certains retrouvant une augmentation significative de la contraction maximale volontaire et/ou du tonus de repos (Matzel et al., 2001; Rosen et al., 2001), pour certains, l'effet sur le rectum est clairement identifié sans nécessairement de modification sur le sphincter (Kenefick et al., 2002b; Vaizey et al., 1999). Ces éléments plaident en faveur d'une action composite associant une cible à la fois sphinctérienne et rectale.

Au-delà même de l'action sur le rectum, la SRS peut avoir une influence plus en amont encore. Parmi les actions supposées, la neurostimulation entraîne une modification de la motricité colique, soit vers une augmentation de celle-ci (Dinning et al., 2007) soit vers une diminution de l'activité motrice colique (Knowles and Martin, 2000). Par ailleurs, l'indication de la SRS a été étendue à des patients atteints de constipation sévère de transit réfractaires aux traitements conventionnels devant l'amélioration du rythme des exonérations et leur qualité (Baeten, 2011), mais également la constipation terminale avec les troubles de l'évacuation du rectum (Knowles et al., 2012). Enfin dans des conditions postopératoires comme après proctectomie ou même après coloproctectomie (Holzer et al., 2008; Meurette et al., 2011; de Miguel et al., 2011) la SRS peut-être un appoint rapporté dans la littérature pour améliorer la continence des patients.

On peut donc supposer, mais sans preuve actuellement, que la SRS est à l'origine d'une stimulation assez globale mettant en jeu d'une part les voies efférentes motrices somatiques, mais également les fibres parasympathiques du plexus pré-sacré, ainsi que les voies afférentes somatiques et autonomes responsables d'une modification de l'activité cérébrale (Gourcerol et al., 2011). Finalement, on pourrait retenir actuellement principalement 3 hypothèses pour expliquer le fonctionnement de la neurostimulation sacrée : la stimulation d'un réflexe somato-viscéral, la modulation de la perception de l'information afférente, et la stimulation périnéale.

Le réflexe somato-viscéral serait médié par l'activation de fibres afférentes issues du nerf pudendal conduisant à une inhibition de l'activité motrice colique par les neurones sympathiques, ainsi qu'une activation du sphincter anal interne. On peut également supposer une activation du système parasympathique pré-sacré par ce même réflexe. La localisation médullaire ou supra-médullaire de ce réflexe reste inconnue et à déterminer. Elle est néanmoins difficile à systématiser, tant les effets des deux systèmes sympathique et parasympathique sont divergents sur la motricité colique et l'appareil sphinctérien.

La modulation de la perception de l'information sensitive serait liée à l'interruption des afférences sensibles au niveau du système nerveux central, par une interruption de l'information par le

courant électrique du neurostimulateur. L'administration de la SRS est en effet continue, empêchant probablement la transmission de tout ou partie des afférences sensitives. Bien qu'hypothétique, cette modulation pourrait avoir sur le SNC l'effet d'une véritable réorganisation des afférences à destinée colique et recto-sphinctérienne. L'existence d'une recrudescence des symptômes à l'arrêt de la SRS (effet ON/OFF) souvent observé (fin de vie de la batterie ou interruption volontaire ou contrainte pour effet secondaire) plaide en faveur d'un tel effet d'interruption des afférences sensitives.

L'effet moteur efférent sur la stimulation périnéale représente le plus validé des effets, puisque perçu directement à la mise en place de l'électrode au niveau de S3 avec une contraction anale sphinctérienne externe associée à une contraction parfois plus globale de la musculature périnéale. Cet effet moteur somatique direct sur le muscle anal constitue le repère pour la stimulation aiguë lors de la mise en place de l'électrode et encore considéré comme le meilleur signe d'un positionnement correct de l'électrode.

### **4.3 Interrogations actuelles et perspectives en termes d'indications pour la SRS**

Le manque de connaissances précises sur le mode d'action de la SRS a été souligné à plusieurs reprises dans la littérature (Maeda and Laurberg, 2011). Or une meilleure description des effets pourrait permettre de mieux sélectionner les patients répondeurs, et d'améliorer les chances de succès à long terme en identifiant des paramètres prédictifs de réponse. Par ailleurs, de nouvelles indications pourraient être proposées si les effets sur la paroi du rectum lui-même étaient mieux décrits (en particulier sur la barrière épithéliale). Un effet de la SRS sur la muqueuse rectale a ainsi déjà été évoqué (Gooneratne et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une diminution de sécrétion de substance P dans la muqueuse de patients traités avec succès par SRS pour incontinence fécale. Cette étude préliminaire est la seule à avoir évalué les effets directs de la SRS, sans pour autant décrire les mécanismes cellulaires expliquant ces modifications. Pour autant, la voie de stimulation parasympathique pré-sacrée semble être empruntée par la SRS, ouvrant des voies de recherches dans le domaine de la voie cholinergique anti-inflammatoire (Bonaz, 2007). Dans ce contexte, nous avons

voulu nous intéresser aux effets de la SRS sur la BEI, en focalisant sur les paramètres de perméabilité et de réponse inflammatoire dans la paroi du rectum, cible de la stimulation nerveuse.

## **Deuxième Partie :**

### **Objectifs**

La SRS digestive est actuellement utilisée dans prise charge des troubles digestifs moteurs de la partie distale du colon et du rectum. Bien que mal décrits, les effets de la SRS passent probablement par une activation du SNE. Compte tenu du rôle clé joué par le SNE dans régulation motricité mais aussi dans le contrôle des fonctions de la BEI, la SRS pourrait être utilisée comme une approche visant à renforcer la BEI. Néanmoins il n'existe pas de preuves d'un tel effet rapporté à ce jour. En revanche, la stimulation vagale a montré chez l'animal qu'elle pouvait renforcer la BEI. Aussi l'objectif principal de cette étude est de démontrer que la SRS peut moduler les fonctions de la BEI. Pour valider cette hypothèse et permettre un transfert rapide de ces données vers des applications chez l'homme, nous avons eu recours à un modèle préclinique.

**Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour objectifs de :**

**1/ développer un modèle de neurostimulation aigue et chronique des racines sacrées percutanée chez le grand animal**

**2/ Identifier dans ce modèle les effets aigus de la neurostimulation sacrée sur les propriétés morpho-fonctionnelles de la BEI**

**3/ Développer chez le grand animal des approches endoscopiques et expérimentales permettant des études longitudinales *ex vivo* de la plasticité du SNE et de son contrôle des fonctions digestives (barrière et motrice)**

**4/ Identifier dans le modèle porcin les effets chroniques de la neurostimulation sacrée sur les propriétés morpho-fonctionnelles de la BEI.**

**5/ Evaluer dans un premier cas clinique l'effet de la SRS chez un patient atteints de RCH**

## **Troisième Partie : Résultats**

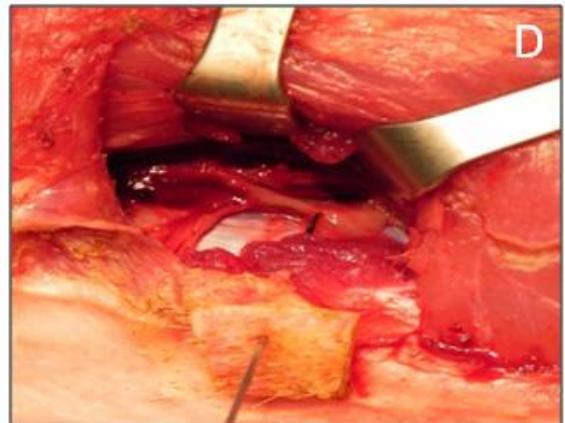
1. Elaboration d'un modèle de stimulation des racines sacrées par voie percutanée chez le porc

Dans un premier temps, notre objectif a été de mettre au point un modèle de SRS chez le grand animal de façon à pouvoir envisager d'étudier les effets de la SRS sur la BEI à partir de biopsies rectales. Le recours à un modèle préclinique a été choisi pour se rapprocher le plus possible des conditions cliniques chez l'homme tant d'un point de vue des conditions de neurostimulation (paramètres) que des similitudes anatomiques digestives et centrales (Lakomy et al., 1993, 1994; Pidsudko et al., 2001; Wojtkiewicz et al., 2012; Zalecki et al., 2012). De plus, le choix du porc a aussi permis de disposer de tissus en quantité suffisante pour évaluer la perméabilité para-cellulaire ex-vivo, mais également les modifications morphologiques et transcriptomique induites par le traitement et ce de façon longitudinale dans le temps.

### **I. Le choix du modèle porcin**

Nous avons opté pour le porc car 2 études ont précédemment rapporté la possibilité d'effectuer de la SRS chez ces animaux d'un poids de 30 à 40 kg (Andersen et al., 2005; Møller et al., 2008). Néanmoins, ces modèles avaient recours à une dissection extensive de la région sacrée, avec une laminectomie postérieure, pour accéder aux racines nerveuses.

Dans ce contexte, une étude préliminaire a été réalisée sur 2 animaux, pour identifier les structures anatomiques, et définir des repères cutanés en vue d'une tentative de ponction percutanée. Les animaux ont été sacrifiés après la séance de dissection dans des conditions opératoires, laminectomie postérieure et exposition des racines S3. La stimulation des racines S3 était responsable d'une contraction homolatérale de l'anus de façon sélective. Toute stimulation électrique à distance (plus d'1cm) de la racine se traduisait par une contraction de la musculature peri-vértebrale ou du membre inférieur homolatéral (**Figure 11**).



**Figure 11: Elaboration du modèle porcine:**

**Repères anatomiques de la 3<sup>ème</sup> racine sacrée par dissection ouverte (n=2)**

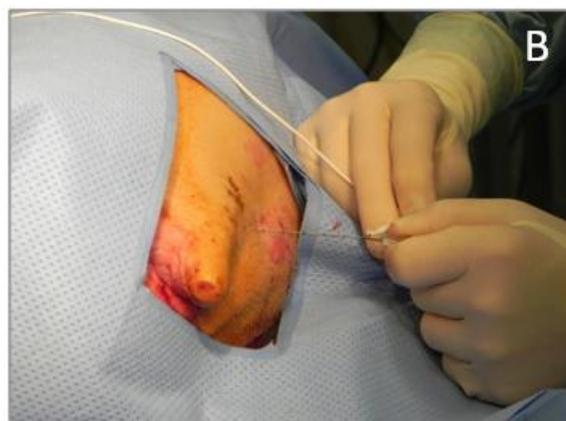
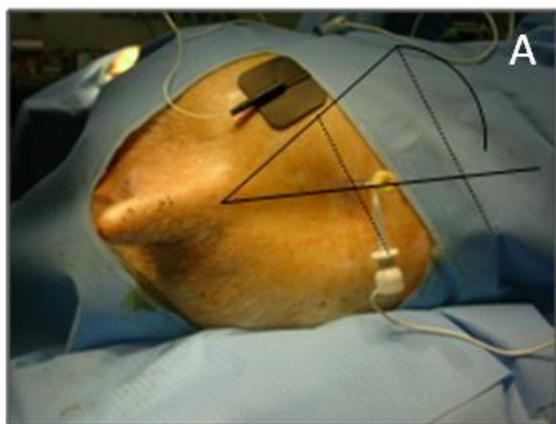
Dissection menée sous anesthésie, animal placé en decubitus latéral droit (A). L'incision part de la ligne médiane, verticale (B). On désinsère progressivement les muscles paravertébraux pour accéder à la racine sacrée S3 (C, flèche)(la stimulation électrique de contact par neurostimulateur externe permet de vérifier la contraction élektive de l'anús ou cours de la dissection). Enfin, le trajet et la profondeur de pénétration de l'aiguille est mesurée, en vue d'une ponction percutanée (D)

## II. Evaluation de l'efficacité de la SRS

L'existence d'une contraction anale sélective homolatérale à la racine stimulée était retenue comme critère principal de bon positionnement des électrodes implantées. Ce paramètre est également utilisé chez l'homme comme critère principal de jugement pour implanter les électrodes. Il n'a pas été possible de contrôler le positionnement des électrodes en radioscopie comme il est effectué chez l'homme mais la définition des repères cutanés et le contrôle de contraction anale nous ont semblés suffisamment discriminants. Nous avons néanmoins prévu d'interrompre la poursuite de l'étude et de vérifier la pertinence des repères anatomiques en cas d'échec répétés de stimulation sur 2 animaux successifs. Par ailleurs, les données manométriques effectuées chez l'homme sont trop hétérogènes pour constituer une méthode d'évaluation reproductible.

## III. Le choix du matériel utilisé pour la SRS

La SRS étant un traitement reconnu et validé pour l'incontinence avec un matériel commercialisé pour effectuer le test par voie percutanée, nous avons utilisé le kit de ponction disponible pour l'appliquer aux animaux (*ref 041828004 Medtronicinc. Minneapolis, Mn USA*). Les stimulateurs externes (n°3625 *Screeener, Medtronicinc. Mn USA*) étaient configurés avec les caractéristiques appliquées à l'homme (14Hz, 210  $\mu$ s, 0.5-1.5V). L'intensité de stimulation était la minimale pour obtenir une contraction bien visible du sphincter anal (**Figure 12**).



**Figure 12: Elaboration du modèle porcin:**

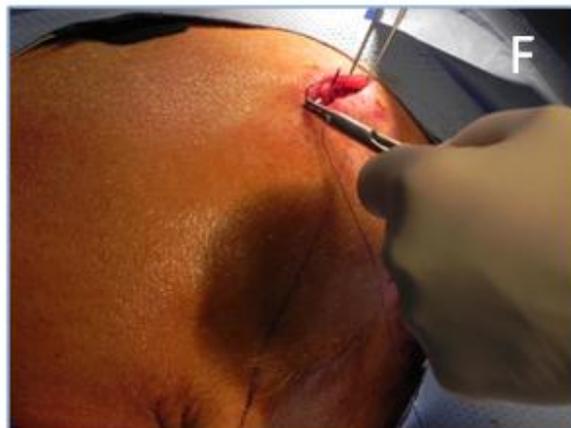
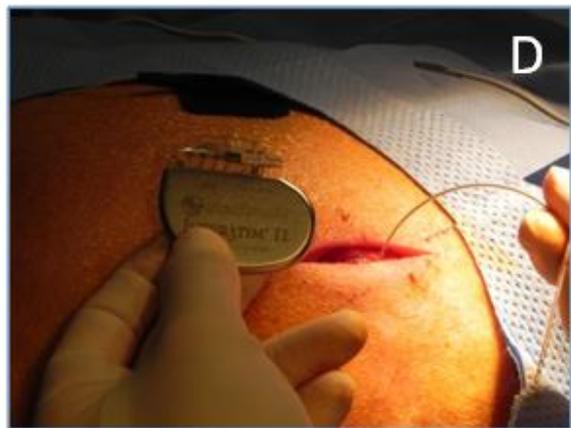
*Définition des repères anatomiques cutanés qui serviront à la ponction percutanée. Mise en place des électrodes par voie percutanée pour stimulation provisoire*

*Les marques sur la peau permettent d'effectuer la ponction percutanée avec reproductibilité. Le point de ponction est à mi-distance entre la base de la queue et le sommet de la crête iliaque homolatérale, à 2 cm de la ligne médiane (A,B). Pour les animaux soumis à stimulation bilatérale, 2 électrodes sont placées symétriquement selon les mêmes repères (C,D). La profondeur de ponction est de 1.5 à 3 cm*

#### **IV. Neurostimulation chronique : protocole**

Pour assurer une stimulation continue sur une période prolongée et évaluer les effets de la SRS sur la barrière épithéliale du rectum à long-terme, nous avons testé l'implantation de Pace-Maker en situation sous-cutanée. Dans ce cas, l'électrode a été mise en place selon le même protocole, puis au cours de la procédure, un boîtier de neurostimulation (*MEDTRONIC INTERSTIM 1,ref 3023Mn USA*) a été implanté en situation sous-cutanée en fosse lombaire. L'intervention était menée sous anesthésie générale, puis les animaux étaient réveillés après réglage des neurostimulateurs (Amplitude 1.5-2V ;Fréquence 14 Hz, Durée impulsion 210  $\mu$ s) de façon identique au protocole réalisé chez l'homme. Une stimulation de 7 jours a été effectuée, avec suivi des animaux, vérification du fonctionnement des stimulateurs quotidienne pendant la durée de l'étude. Au 7<sup>ième</sup> jour, les animaux ont été de nouveau anesthésiés, pour biopsie rectale à distance du site initial de biopsie, puis ablation du matériel et sacrifice des animaux.

Le matériel était désinfecté selon une procédure de désinfection de contact pendant une durée de 2 heures pour une réutilisation ultérieure. Il n'a pas été possible d'utiliser du matériel stérile non réutilisé pour chacune des procédures. Néanmoins, le matériel était testé à chaque expérimentation, en termes de vitalité de batterie et de paramétrage de stimulation. Au total, 4 stimulateurs ont été utilisés (**Figure 13**).



**Figure 13: Elaboration du modèle porcin:**

*Mise en place du dispositif de neurostimulateur implanté pour traitement chronique  
 Electrodes placées par voie percutanée, remplacées par un guide (A). Ce dernier permet  
 l'introduction d'un dilateur puis de l'électrode définitive type Spinelli (B). Le bon  
 positionnement est vérifié à nouveau par une stimulation externe. Tunnélisation de l'électrode  
 (C) amenée en fosse lombaire. On relie l'électrode au boîtier de neurostimulation stérile (D).  
 Dans une logette aménagée le boîtier est positionné puis activé par la télécommande*

*(paramètres de stimulation 210us; 14Hz, 0.5-1.5v)(E). La plaie est refermée, recouvrant l'ensemble du matériel implanté (F)*

## **V. Hébergement des animaux et conditions d'expérimentations**

Les interventions sur le cochon ont été effectuées au Laboratoire des Grands Animaux (LGA-INSERM U 643, Pr G. Blancho) en accord avec les règles vétérinaires en vigueur, le centre a reçu l'agrément des organismes de tutelles (inscription E.44010). Les animaux utilisés étaient âgés de 6 mois, à maturité sexuelle, sans particularité génétique, les animaux étaient naïfs (porcs d'élevage). Les interventions ont été effectuées sous anesthésie générale au bloc opératoire dédié aux expérimentations sur grand animal dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Après une induction anesthésique comprenant Isoflurane 2% et Nitrous-Oxide 60%, suivi d'un entretien par Isofluran 2%. Les animaux étaient intubés, sous ventilation artificielle avec monitoring des constantes hémodynamiques, et ne recevaient pas de curarisation, ni d'antibiothérapie systématique. Placés en décubitus latéral droit, nous avons pu expérimenter la stimulation sacrée droite, gauche et bilatérale. Les kits de neurostimulation percutanée comprenaient des aiguilles de ponctions de tailles standards stériles. Le même modèle a été utilisé pour tous les animaux.

## 2. Effets de la SRS aigue sur la BEI

### **Article n°1**

La SRS est un traitement actuel des troubles moteurs de la partie distale de l'intestin, en particulier au niveau du côlon, du rectum et de l'anus. Son mécanisme d'action, partiellement connu passe peut-être par une activation du SNE. Au vu du rôle du SNE à la fois sur la motricité mais aussi sur la BEI, nous avons voulu tester les effets de la SRS sur la BEI. De plus, des données controversées suggèrent une différence entre stimulation unilatérale et bilatérale, nous avons donc voulu comparer ces 2 modalités en termes d'impact sur la BEI.

Par analogie avec la capacité de médiateurs inflammatoires ou neuromédiateurs à moduler rapidement la perméabilité (ie 1-3h), nous avons fixé la durée de stimulation à 3 heures afin d'identifier l'effet potentiel de la SRS sur BEI. Par ailleurs, cette durée nous permettait de maintenir les animaux dans des conditions stables d'anesthésie, en termes d'oxygénation et de tolérance hémodynamique.

### **Design de l'étude**

Sous anesthésie générale, nous avons comparé 3 groupes d'animaux : un groupe de 6 animaux recevant une SRS unilatérale, 6 autres recevant une SRS bilatérale ; enfin, un groupe contrôle de 6 animaux sans stimulation.

Tout d'abord, une biopsie du rectum par voie transanale était effectuée avant stimulation. Cette biopsie servait de valeur de référence initiale pour l'évaluation de l'ensemble des paramètres étudiés décrits ci après. Après 3 heures de stimulation sous AG, une nouvelle biopsie rectale était réalisée à distance de la précédente avant sacrifice des animaux.

Parmi les paramètres évalués sur les biopsies figuraient comme objectifs principaux : la perméabilité para-cellulaire de la BEI, l'excrétion de mucus, l'épaisseur de l'épithélium de la muqueuse, la désquamation de l'épithélium de surface, la mesure de la morphologie des cryptes.

D'autres évaluations complémentaires ont été réalisées par RT-qPCR et/ou Western blot: l'expression des protéines de complexes jonctionnels (Claudine-1, Occludine, ZO-1), MLC, MLCK et enfin, les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL8, IFN $\gamma$ ).

## **Les résultats**

Cette étude a d'abord montré que le modèle de SRS chez le porc était faisable et reproductible, avec la technique de ponction percutanée. En effet, 18 ponctions de racines sacrées chez 12 animaux ont permis de reproduire la SRS sans échec. La contraction anale sélective homolatérale qui représentait notre critère de jugement principal était retrouvée à chaque fois pour la stimulation unilatérale et bilatérale.

Le résultat principal de notre étude a été de montrer que la SRS avait un effet de renforcement de la BEI caractérisé par une diminution de la perméabilité para-cellulaire et une augmentation de la sécrétion de mucus. De manière intéressante, la stimulation bilatérale était significativement plus efficace pour diminuer la perméabilité para-cellulaire que la stimulation unilatérale.

Cette étude a montré par ailleurs que ces modifications fonctionnelles n'étaient pas associées à des modifications de l'expression des ARNm des protéines de jonctions serrées, ni de modification d'expression des protéines MLC / MLCK, ni d'ARN de cytokines inflammatoires dans la muqueuse rectale (données complémentaires)

## **Conclusion**

En conclusion, cette étude a permis d'identifier la BEI comme une nouvelle cible de la SRS. De plus, la réalisation de cette étude dans un modèle préclinique ouvre des perspectives de transfert rapide de cette méthode dans des pathologies humaines associées à des dysfonctions de la BEI.

## **Article 1**

Neurogastroenterol Motil. 2012 Mar;24(3):267-73, e110

Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model.

**Meurette G**, Blanchard C, Duchalais-Dassonneville E, Coquenlorge S, Aubert P, Wong M, Lehur PA, Neunlist M.

# Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model

G. MEURETTE,<sup>\*,†,‡</sup> C. BLANCHARD,<sup>\*,†,‡</sup> E. DUCHALAIS-DASSONNEVILLE,<sup>\*,†,‡</sup> S. COQUENLORGE,<sup>\*,†,‡</sup>  
P. AUBERT,<sup>\*,†,‡</sup> M. WONG,<sup>‡</sup> P.-A. LEHUR<sup>‡</sup> & M. NEUNLIST<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>\*</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U913, Nantes, France

<sup>†</sup>Université de Nantes- Faculté des Sciences et Techniques, Nantes, France

<sup>‡</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Clinique de chirurgie digestive, CHU Nantes, France

## Abstract

**Background** The mechanism of action of sacral nerve stimulation (SNS) remains largely elusive. The aims of this study were to develop a clinically relevant animal model for percutaneous SNS and to describe its effect on the epithelial barrier of the rectum. **Methods** Under general anesthesia and after percutaneous electrode placement for S3 nerve root stimulation, six pigs underwent unilateral stimulation and six bilateral stimulation. Animals were stimulated for 3 h using an external pulse generator (1–2.5 V; 14 Hz; 210  $\mu$ s). Six animals underwent electrode implantation without stimulation and served as controls. Full-thickness rectal biopsies were performed prior to and after stimulation. Paracellular permeability was evaluated by measuring sulfonic acid flux across the rectal mucosa in Ussing chambers. Histological assessment of mucosal thickness, epithelial desquamation, and mucus expression were performed. **Key Results** Percutaneous stimulation resulted in successful anal contractions whose amplitude and uniformity was enhanced following bilateral compared with unilateral stimulation. In controls, paracellular permeability significantly increased during the stimulation period whereas it remained unchanged following unilateral stimulation. In contrast, permeability was significantly reduced by bilateral stimulation. This effect was associated with a concomitant reduction in mucosal thickness and a trend toward increased amount of mucus on surface epithelium compared with controls. **Conclusions** &

**Inferences** The development of a porcine model of percutaneous SNS revealed the ability of neuromodulation to reinforce rectal epithelial barrier. Furthermore, our results suggest that SNS could be used for treatment of gastrointestinal pathologies with reduced rectal mucosal barrier functions

**Keywords** animal model, barrier function, sacral nerve stimulation.

**Abbreviations:** ENS, enteric nervous system; IEB, intestinal epithelial barrier; SNS, sacral nerve stimulation.

## INTRODUCTION

Sacral nerve stimulation (SNS) has been shown to be effective in the treatment of severe fecal incontinence resulting in a significant improvement in continence and quality of life of affected individuals.<sup>1–3</sup> Despite being one of the most significant developments in the management of fecal incontinence over the past decade, the precise mechanisms of action remains elusive and a matter of debate.<sup>4,5</sup> Postulates include a direct increase in sphincter tone, modulatory effects on rectal and colonic motility, and central nervous system adaptation.<sup>6</sup>

Among other gut functions putatively targeted by SNS are the intestinal epithelial barrier (IEB) functions. In fact, recent studies have shown that electrical stimulation of the vagal nerve enhances IEB resistance and reduce paracellular permeability during gut insults.<sup>7,8</sup> Interestingly, evidences suggest that SNS stimulates not only sympathetic but also presacral parasympathetic plexus.<sup>6</sup> In addition, neuromediators such as acetylcholine or vasoactive intestinal peptide (VIP) have been shown to increase and decrease paracellular permeability, respectively.<sup>9,10</sup> Furthermore, IEB lesions characterized by increased paracellular permeability have been identified in several gastrointestinal diseases

## Address for Correspondence

Guillaume Meurette, Inserm U913- Clinique de chirurgie digestive et endocrine, CHU Nantes, France.  
Tel: +33240083022; fax: +33240083036;  
e-mail: guillaume.meurette@chu-nantes.fr

Received: 5 October 2011

Accepted for Publication: 6 November 2011

associated with motility dysfunctions, such as Irritable Bowel Syndrome (IBS).<sup>11</sup> In this context, reducing paracellular permeability reduces visceral hypersensitivity in animal model of IBS<sup>12</sup> and even prevents the development of intestinal inflammation in IL10<sup>-/-</sup> mice.<sup>13</sup> However, it remains currently unknown as to whether SNS can also modulate IEB functions, and in particular paracellular permeability, offering another potential explanation for its mechanism of action.<sup>6</sup>

Unraveling the precise mechanisms of action of SNS and the identification of novel therapeutic targets have been somewhat hampered over the years by the lack of feasible animal models on which to conduct relevant translational human trials. Animal models of SNS performed in rats, dog, and rabbits have identified possible mechanisms by which SNS affect gut motility, but the results have been conflicting at best, probably the result of interspecies differences and difficulties in assessing treatment outcomes, particularly with anal manometry.<sup>14</sup> An alternative animal model that could be used to address the current shortfalls in existing animal models, both from a physiological and therapeutic standpoint, is the pig. Indeed, the porcine anatomy is more closely related to that of humans and thus more relevant than smaller animals models<sup>15</sup> allowing more similar treatment parameters and protocols to be adapted for use in humans. In addition, pigs have also recently been used to better characterize the impact of SNS on voiding dysfunction. These studies have demonstrated a superior efficacy of bilateral stimulation compared with unilateral stimulation on bladder function.<sup>16</sup> At present, however, all animal models for SNS have involved an invasive laminectomy for the placement of electrodes, which fails to replicate the percutaneous approach used in humans, which in itself could affect the true efficacy and interpretation of results gleaned from such trials as a result of the added morbidity of the laminectomy.

Therefore, the aims of our study was thus to firstly evaluate the feasibility of the percutaneous approach for SNS in a porcine model and to subsequently determine the effects of SNS upon epithelial barrier functions in the rectum.

## MATERIAL AND METHODS

### Porcine model for percutaneous SNS

A total of twenty pigs (weighing between 30 and 40 kgs) were used in this study. All pigs were 6 months old and had achieved sexual and brain maturity.<sup>17</sup> Experiments were performed in a dedicated surgical facility of the Research Laboratory, LGA (Laboratoire des grands animaux, INSERM U 643), in accordance with French Veterinary Regulations and Ethics Committee standards (Agree-

ment: E.44010). All procedures were performed under general anesthesia, with animals in the right lateral position, with induction by Isofluran 5% and nitrous-oxide 60% and thereafter maintained on Isofluran 2%. The SNS started at least after a mean 30 min of steady state anesthesia to minimize the influence of drugs of the induction phase on the central or peripheral nervous system.

After cleaning with an iodine-based solution and draping, percutaneous placement of electrodes was performed using the conventional peripheral nerve evaluation test kits for humans (Medtronic™ number 041828-004; Medtronic inc. Minneapolis USA) and using surface landmarks predefined in preliminary experiments (Fig. 1A,B). Further confirmation of the accurate electrode placement was obtained with a laminectomy performed in the two-first stimulated animals (Fig. 1C,D).

Twelve animals underwent percutaneous S3 stimulation, with six of them undergoing unilateral stimulation and the other six undergoing bilateral stimulation. The control group (sham stimulated) comprised six animals submitted to percutaneous puncture at the same landmarks without stimulation. Electrode placement and stimulation was deemed satisfactory when contractions of the anal sphincter were observed. Stimulation duration was set at 3 h and stimulation intensity was set at the minimum level required to obtain anal contraction (1–2.5 V; 14 Hz, 210  $\mu$ s) using an external pulse generator (Medtronic™ Model 3625 Screener).

For each pig, two full-thickness rectal biopsies 3 cm above the dentate line were performed via a transanal approach before and after SNS. The rectal biopsy sites were primarily sutured for hemostasis. At the end of SNS procedure, the animals were sacrificed by intravenous injection of pentobarbital.

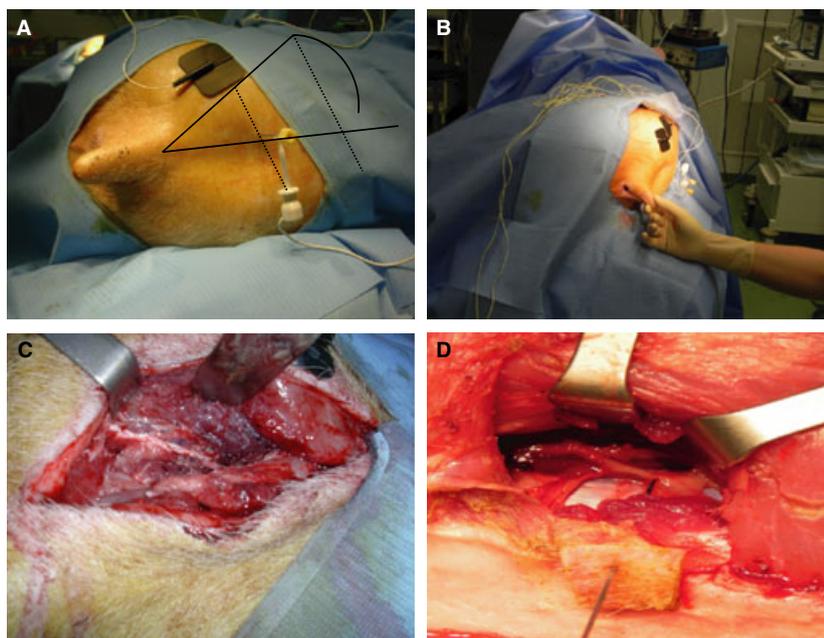
### Ex-vivo assessment of rectal paracellular permeability

Each biopsy was placed in ice cold Krebs solution (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.187 g L<sup>-1</sup>, NaCl 6.84 g L<sup>-1</sup>, KCl 0.35 g L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2.10 g L<sup>-1</sup>, Glucose 1.98 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.368 g L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.244 g L<sup>-1</sup>) and sent to the laboratory for immediate processing and analysis. Each specimen was micro-dissected to separate the mucosa from the submucosa (in the plane of the submucosal blood vessels).

Specimens of rectal mucosa were then mounted in dedicated Ussing chambers (Transcellab, TBC, Paris, France) exposing a mean surface of 0.0314 cm<sup>2</sup>. Specimens were bathed on each side in 1.5 mL of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12, Invitrogen, France). The media was continuously oxygenated and maintained at 37 °C by a gas flow of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. After an equilibration period of 30 min, 150  $\mu$ L of apical medium was replaced by 150  $\mu$ L of fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg mL<sup>-1</sup>, 400 D, Invitrogen, France). The fluorescence level of basolateral aliquots of 150  $\mu$ L was measured at 30 min intervals over a period of 180 min using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time using a linear regression fit model measured in the specimens (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA).

### Histological evaluation of the impact of SNS upon rectal mucosa

Following microdissection, specimens of mucosa were fixed in paraformaldehyde (4% in PBS). After tissue washing in PBS, they were dehydrated and embedded in paraffin. Sequential sections of mucosa (5  $\mu$ m) were made. Bilateral stimulated and control tissues were analyzed by classical microscopy following haemat-



**Figure 1** Electrode placement landmarks. (A) Percutaneous placement of electrode for unilateral SNS using defined landmarks. (B) Percutaneous placement of electrodes for bilateral SNS. (C) Following laminectomy and dissection, S3 root is approximately 2 mm in diameter and clearly isolated. (D) Dissection after SNS revealed the close proximity between the electrode and the S3 nerve root.

oxylin-eosin staining. Each section was observed under an Olympus IX 50 microscope (Olympus Inc., Center Valley, PA, USA). Pictures were acquired using a digital camera DP71 (Olympus), connected to a computer through a frame grabber card (Cell B software, Olympus). Three parameters were analyzed to describe the morphology of the mucosa, as previously reported<sup>18</sup>: (i) mucosal thickness was determined by measuring the distance between the surface epithelium and the underlying muscularis mucosae, (ii) the height of the surface epithelium and (iii) assessment of the surface epithelium continuity (% of continuous epithelium along the mucosal surface). The mean values were therefore computed on a total of 10 fields (three values per field) examined per experiment and per condition. Investigators were blinded for histological observations.

### Assessment of the impact of SNS upon mucus expression in the mucosa

Sections of mucosa (5  $\mu$ m) of bilateral stimulated and control tissues were analyzed using classical microscopy following alcian blue staining. Evaluation of mucus expression on the surface epithelium and in the crypts was determined using a semi-quantitative standardized score defined as follows:

- 0 No mucus on the field
- 1 Small amount of mucus (<25% of the surface epithelium)
- 2 Average amount of mucus (25–75% of the surface epithelium)
- 3 Large amount of mucus (>75% of the surface epithelium)

### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using Prism (GraphPad Prism 5, La Jolla, CA, USA). To determine differences between two groups or between multiple groups, Wilcoxon test or Kruskal–Wallis followed by Dunn's tests were used, respectively. Linear regres-

**Table 1** Clinical parameters monitored during the experiments

	Temperature		Heart rate		Oxygen saturation	
	Start	End	Start	End	Start	End
Mean $\pm$ SD	37.1 $\pm$ 0.5	35.6 $\pm$ 1.2*	88 $\pm$ 8	107 $\pm$ 42	95 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2

\* $P < 0.05$  compared with the start of stimulation.

sion analysis was also performed. A  $P$ -value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## RESULTS

### Percutaneous SNS in a porcine model

All 12 pigs undergoing stimulation had successful contractions of the anal sphincter. Clinical parameters (body core temperature, heart rate, and blood pressure) were monitored throughout the experiments in each group (Table 1). No significant variation was observed in heart rate and blood pressure either within or between the treatment groups. However, body temperature decreased significantly during the course of the experiments, but not differently between the three groups.

The anatomical landmarks of electrode position were measured in eight animals at the end of the

procedure. The electrodes were positioned at an average of  $12.0 \pm 2.5$  cm ( $n = 8$ ) from the anal margin and 1 cm lateral to the vertebral midline, up to an average depth of  $3.9 \pm 0.2$  cm ( $n = 8$ ).

Unilateral stimulation resulted in ipsilateral spastic contractions of the anus, whereas bilateral stimulation not only enhanced contraction amplitude, but also produced a more uniform contraction of the entire anal sphincter complex (Video S1). These contractions remained sustained during the whole stimulation procedure.

### Effect of SNS upon rectal paracellular permeability

Paracellular permeability at the beginning of the experiment was similar in all three groups ( $P = 0.31$ ;  $n = 18$ ). In controls (sham stimulated), paracellular permeability increased by 24% ( $P = 0.03$ ;  $n = 6$ ) between the beginning and the end of the experimental procedure (Fig. 2A). During unilateral SNS, paracellular permeability remained unchanged ( $P = 0.84$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 2B). In contrast, paracellular permeability was significantly reduced by 20% following bilateral stimulation ( $P = 0.03$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 2C). Furthermore, compared with controls, changes in paracellular permeability induced during the course of SNS were

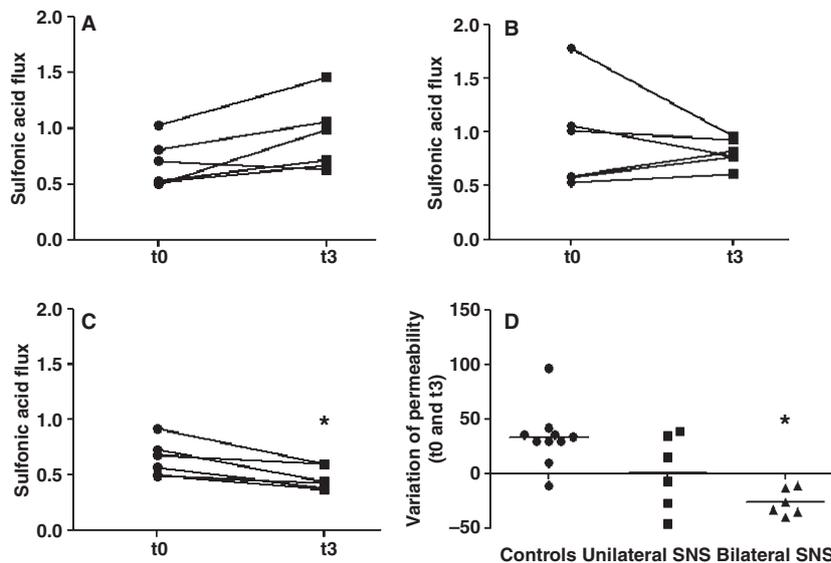
significantly reduced following bilateral, but not unilateral SNS (Fig. 2D).

### Effects of SNS upon mucosal histology

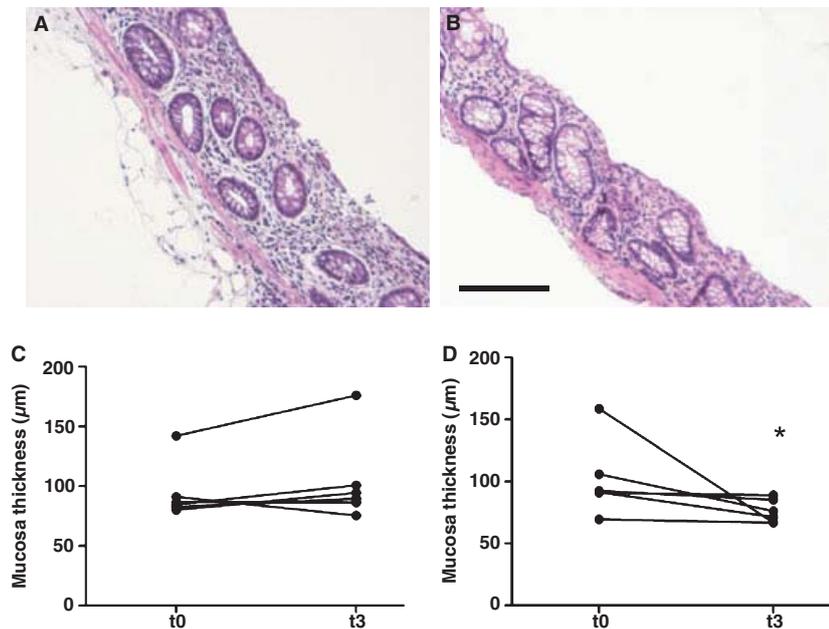
We next focussed the study on bilateral SNS and controls, as it had more significant effects upon rectal barrier permeability than unilateral SNS. In controls, rectal mucosa thickness did not change between the beginning and the end of the procedure ( $93 \pm 34$  vs  $87 \pm 21$   $\mu\text{m}$ , respectively;  $P = 0.31$ ) (Fig. 3A,C). In contrast, mucosa thickness was significantly reduced between the beginning and the end of bilateral stimulation ( $101 \pm 30$  vs  $75 \pm 9$   $\mu\text{m}$ , respectively;  $P = 0.03$ ) (Fig. 3B,D). Concerning the surface epithelium continuity and height, no significant difference was observed between the control and the SNS group (data not shown).

### Effects of SNS upon epithelial mucus distribution

Concerning bilateral SNS, the score reflecting the amount of mucus at the surface of the epithelium was increased at the end of the stimulation procedure compared with the beginning ( $0.30 \pm 0.21$  vs  $0.15 \pm 0.09$ , respectively;  $P = 0.06$ ; Fig. 4B,D). In contrast, in controls the mucus scores remained



**Figure 2** Impact of sacral nerve stimulation (SNS) on paracellular permeability. (A) In controls (sham stimulated) paracellular permeability increased significantly between the beginning (t0) and the end of the procedure (t3). (B) During unilateral SNS, no significant change in paracellular permeability occurred. (C) Following bilateral SNS, paracellular permeability decreased significantly. Individual values represent the mean obtained from two segments per animal and per condition. \* $P < 0.05$  Wilcoxon test. (D) Impact of SNS upon the changes in paracellular permeability induced during the course of the experiments. Changes in paracellular permeability were significantly different between control and bilateral SNS \* $P < 0.05$  Kruskal–Wallis followed by Dunn’s test.



**Figure 3** Impact of sacral nerve stimulation (SNS) on mucosal histology. Sections of mucosa from control (A) and bilateral SNS (B) stimulated pigs were stained with hematoxylin eosin and observed under a microscope. Mucosal thickness in the bilateral stimulated group (D) was significantly reduced at the end of the 3 h stimulation period (t3) compared with the beginning (t0). In contrast, no change in mucosal thickness was observed in the control group (C). Individual data represent the mean of three measures per field and 10 fields per animal and condition. \* $P < 0.05$  Wilcoxon test. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

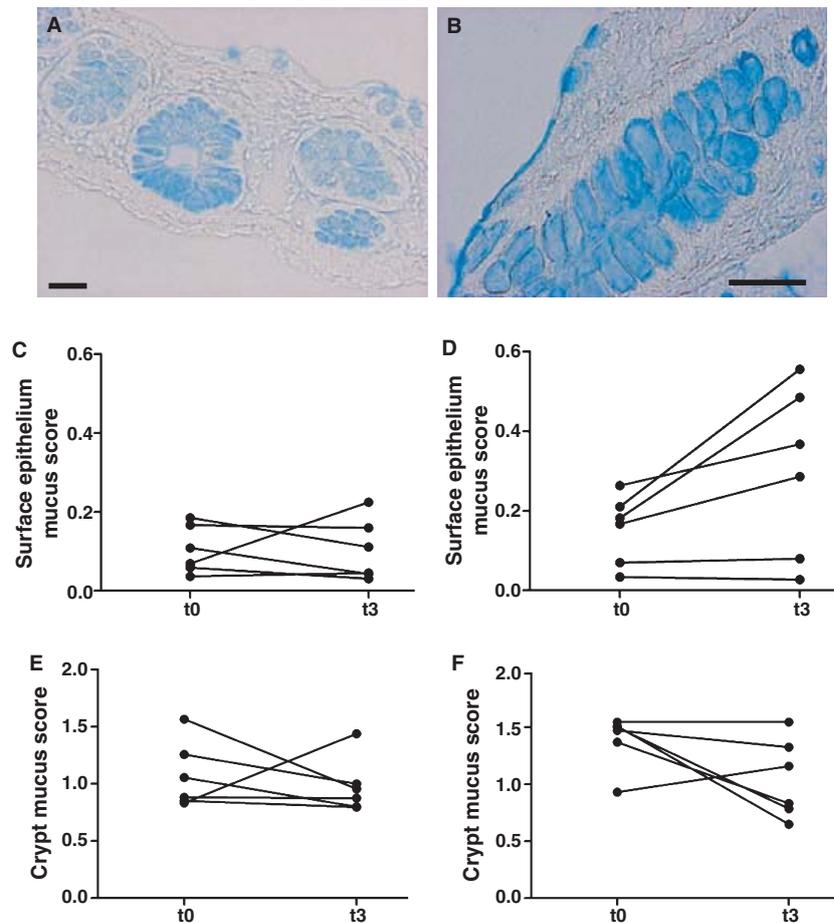
unchanged after 3 h ( $0.10 \pm 0.08$  vs  $0.09 \pm 0.06$ , respectively;  $P = 0.47$ ; Fig. 4A,C). No difference was measured in the mucus score of the crypts in both groups (Fig. 4E,F). However, interestingly, in stimulated pigs, the surface epithelium mucus score and the crypt mucus score were positively and linearly correlated ( $r^2 = 0.88$  and  $P = 0.03$ ).

## DISCUSSION

In this study, we have first demonstrated the feasibility of a porcine model for percutaneous SNS, avoiding the morbidity of a laminectomy-based approach, providing therefore a suitable large animal model for SNS research. Secondly, to the best of our knowledge, this is also the first study showing that sustained SNS induces a significant reduction in mucosal paracellular permeability of the rectum, together with a concomitant reduction in mucosal thickness and increased surface mucus secretion.

A first result of this pilot study was the observation that bilateral SNS significantly reduced paracellular permeability of the rectal mucosa. Although unilateral did not decrease paracellular permeability, it prevented the increase in paracellular permeability observed in sham animals. These results performed on small-sized groups need to be confirmed in the future on larger

animal samples. Previous studies have shown that vagal stimulation can enhance IEB resistance and reduce paracellular permeability in the small intestine.<sup>7,8</sup> The effects of vagal stimulation could be ultimately mediated by enteric neurons and/or glial cells, as vagal stimulation increases enteric neuronal activity.<sup>19,20</sup> Consistently, direct electrostimulation of the human enteric nervous system has also been shown to reduce paracellular permeability of intestinal epithelial monolayers.<sup>10</sup> Our results obtained with SNS extend these findings to regions of the digestive system that are not under direct vagal control (i.e. distal colon and rectum). The SNS could exert its effects upon the rectal barrier through stimulation of parasympathetic presacral plexus, which has been shown to be activated during SNS stimulation.<sup>6</sup> However, to date, the mediators responsible for the barrier reinforcing effects of SNS remain to be identified. Among putative candidates, vasoactive intestinal peptide or S-Nitrosoglutathione have been identified as enteric neuro-glial mediators enhancing barrier functions.<sup>21,22</sup> Interestingly, these mediators can reduce paracellular permeability over short-term periods similar to the duration of SNS used in our study. The ability of bilateral SNS, but not unilateral SNS to reduce paracellular permeability could be due to the increased release of mediators by bilateral SNS com-



**Figure 4** Effects of sacral nerve stimulation (SNS) upon epithelial mucus distribution. Sections of mucosa from control (A) and bilateral SNS (B) stimulated pigs were stained with alcian blue and observed under a microscope. In controls, the score reflecting the amount of mucus at the surface of the epithelium remained unchanged after 3 h (C). In the bilateral SNS group, the mucus score was increased at the end of the stimulation procedure compared with the beginning ( $P = 0.06$ ; Wilcoxon test) (D). No difference in mucus score was measured in the crypts of the control (E) and the bilateral SNS group (F). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

pared with unilateral one. Interestingly, improved results of bilateral SNS compared with unilateral stimulation have been reported in the management of voiding dysfunction,<sup>16</sup> but also in the treatment of fecal incontinence.<sup>23</sup>

We have further demonstrated that SNS increased epithelial surface mucus amount. This could be due to an increase in mucus secretion induced by SNS. Indeed, previous studies have shown that neuromediators or activation of the ENS can induce mucus secretion.<sup>24,25</sup> Consistently, this increase in surface epithelium mucus amount was correlated with the amount of mucus observed in the crypts, suggesting a secretory process. Altogether, increased mucus amount on surface epithelium could, besides reduced paracellular permeability, also enhance barrier protection by SNS.

The exact mechanism of action of SNS in treating fecal incontinence remains still largely unknown.<sup>6</sup> Apart from a direct effect on sphincter tone, SNS has been shown to modify colonic motility,<sup>26,27</sup> probably via the activation of central and peripheral nervous pathways.<sup>28,29</sup> Our findings offer new insights into the possible mechanism of action, in which SNS reinforces the rectal mucosa barrier. In particular, the effects of SNS upon mucosal barrier functions could be involved in the success of SNS reported in patients with IBS, chronic constipation and chronic pelvic pain.<sup>29-32</sup> In addition, recent reports highlight the need for a critical appraisal of the criteria for selecting patients for SNS.<sup>4,5</sup> In this context, our findings set the basis for evaluating the effects of SNS upon paracellular permeability in patients treated for fecal incontinence. If correlated to improvement of anorectal functions, these

changes in paracellular permeability induced by SNS could be used as future new marker of response to SNS. Therefore, such a parameter could improve the early selection of responding patients during the peripheral nerve evaluation phase and the subsequent definitive pacemaker implantation. Provided reinforcement of the rectal barrier by SNS is confirmed in humans, its potential benefits in gastrointestinal pathologies with impaired mucosal barrier should be evaluated.

In conclusion, this study describes the first porcine model for percutaneous SNS that best replicates the technique routinely employed in humans for the treatment of severe fecal incontinence. We further demonstrate that SNS can reduce paracellular permeability of the rectal mucosa. These findings offer new

insights into the mechanisms of action of SNS on anorectal functions. Furthermore, SNS could offer new therapeutical perspectives for treatment of gastrointestinal pathologies with reduced mucosal barrier functions

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank David Minault, Jeremy Hervouet, and Pr Gilles Blanco for their expertise and help during the experiments. The authors also thank Julien Chevalier and Maxime Mahe for their technical assistance. The present study received supports by grants from 'La Fondation Benoit Malassagne' and 'La Fondation de l'Avenir' attributed to CB. Devices required for the experiments (pulse generator and PNE test-kit) were provided by Medtronic Inc.

## REFERENCES

- Jarrett ME, Mowatt G, Glazener CM *et al.* Systematic review of sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation. *Br J Surg* 2004; **91**: 1559–69.
- Matzel KE, Stadelmaier U, Hohenfellner M *et al.* Electrical stimulation of sacral spinal nerves for treatment of faecal incontinence. *Lancet* 1995; **346**: 1124–7.
- Leroi AM, Parc Y, Lehur PA *et al.* Efficacy of sacral nerve stimulation for fecal incontinence: results of a multicenter double-blind crossover study. *Ann Surg* 2005; **242**: 662–9.
- Maeda Y, Laurberg S. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann Surg* 2011; **254**: 174–5.
- Wexner SD. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann Surg* 2011; **254**: 175–6.
- Gourcerol G, Vitton V, Leroi A *et al.* How sacral nerve stimulation works in patients with faecal incontinence. *Colorectal Dis* 2011; **13**: e203–11.
- Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H *et al.* The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1122–30.
- Costantini TW, Bansal V, Krzyzaniak M *et al.* Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G1308–18.
- De Quelen F, Chevalier J, Rolli-Derinderen M *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids in the maternal diet modify the postnatal development of nervous regulation of intestinal permeability in piglets. *J Physiol* 2011; **589**: 4341–52.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T *et al.* 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* 2003; **285**: G1028–36.
- Piche T, Barbara G, Aubert P *et al.* Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; **58**: 196–201.
- Ait-Belgnaoui A, Bradesi S, Fioramonti J, Theodoram V, Bueno L. Acute stress-induced hypersensitivity to colonic distension depends upon increase in paracellular permeability: role of myosin light chain kinase. *Pain* 2005; **115**: 141–7.
- Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene deficient mouse. *Gut* 2009; **58**: 41–8.
- Ridolfi TJ, Tong WD, Takahashi T *et al.* Sympathetic and parasympathetic regulation of rectal motility in rats. *J Gastrointest Surg* 2009; **13**: 2027–33.
- Andersen IS, Rijkhoff NJ, Vukovic A *et al.* Anorectal motility responses to selective stimulation of the ventral sacral nerve roots in an experimental model. *Br J Surg* 2005; **92**: 1513–9.
- Kaufmann S, Naumann CM, Hamann MF *et al.* Unilateral vs bilateral sacral neuromodulation in pigs with formalin-induced detrusor hyperactivity. *BJU Int* 2009; **103**: 260–3.
- Lind NM, Moustgaard A, Jelsing J *et al.* The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; **31**: 728–51.
- Flamant M, Aubert P, Rolli-Dekindere M *et al.* Enteric glia protect against *Shigella Flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 2011; **60**: 473–84.
- Berthoud HR, Lynn PA, Blackshaw LA. Vagal and spinal mechanosensors in the rat stomach and colon have multiple receptive fields. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **280**: R1371–81.
- Schemann M, Grundy D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992; **263**: G709–18.
- Nylander O, Wilander E, Larson GM *et al.* Vasoactive intestinal polypeptide reduces hydrochloric acid-induced duodenal mucosal permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1993; **264**: G272–9.
- Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C *et al.* Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; **132**: 1344–58.
- Matzel K, Stadelmaier U, Bittorf B *et al.* Bilateral sacral spinal nerve stimulation for fecal incontinence after low anterior rectum resection. *Int J Colorectal Dis* 2002; **17**: 430–34.

- 24 Toumi F, Neunlist M, Casagnau E *et al.* Human submucosal neurones regulate intestinal cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 2003; **15**: 239–42.
- 25 Plaisancie P, Barcelo A, Moro F *et al.* Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol* 1998; **275**(5 pt 1): G1073–84.
- 26 Dinning PG, Fuentealba SE, Kennedy ML *et al.* Sacral nerve stimulation induces pan-colonic propagating pressure waves and increases defecation frequency in patients with slow-transit constipation. *Colorectal Dis* 2007; **9**: 123–32.
- 27 Kenefick NJ, Emmanuel A, Nicholls RJ *et al.* Effects of sacral nerve stimulation on autonomic nerve function. *Br J Surg* 2003; **90**: 1256–60.
- 28 Giani I, Novelli E, Martina S *et al.* The effect of sacral nerve modulation on cerebral evoked potential latency in fecal incontinence and constipation. *Ann Surg* 2011; **254**: 90–96.
- 29 Griffin KM, Pickering M, O'Herlihy C *et al.* Sacral nerve stimulation increases activation of the primary somatosensory cortex by anal canal stimulation in an experimental model. *Br J Surg* 2011; **98**: 1160–9.
- 30 Lundby L, Krogh K, Buntzen S *et al.* Temporary sacral nerve stimulation for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; **51**: 1074–8.
- 31 Kamm MA, Dudding TC, Melenhorst J *et al.* Sacral nerve stimulation for intractable constipation. *Gut* 2010; **59**: 333–40.
- 32 Maeda Y, Lundby L, Buntzen S *et al.* Suboptimal outcome following sacral nerve stimulation for faecal incontinence. *Br J Surg* 2011; **98**: 140–7.

## SUPPORTING INFORMATION

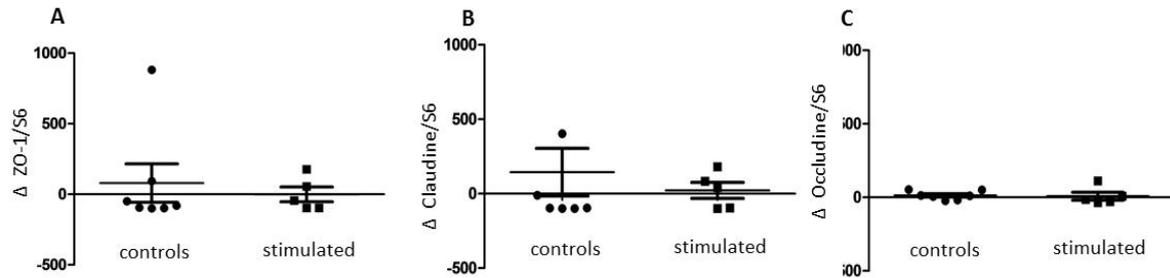
Additional supporting information may be found in the online version of this article:

**Video S1.** Assessment of anal contraction during bilateral SNS in pig. Right and left S3 stimulation lead to right side (first arrow) and left side (second arrow) anal sphincter contraction respectively. Bilateral stimulation causes a full sphincter contraction.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author of the article.

## Résultats complémentaires

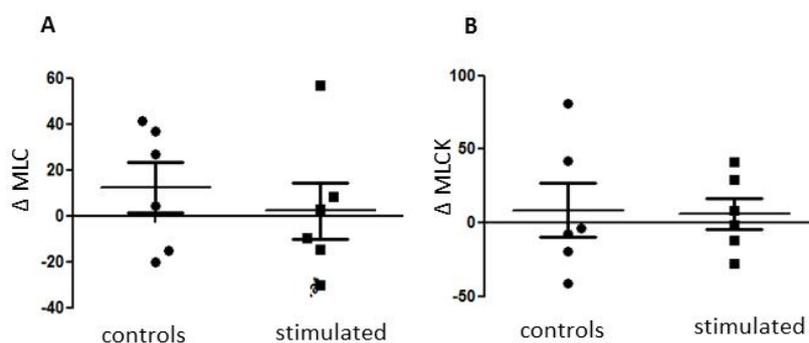
**Impact de la SRS sur l'expression d'ARNm des molécules de jonctions serrées (ZO-1, Claudine) en rt-PCR.** Nous n'avons pas observé de modifications de l'expression des ARNm issus de la muqueuse rectale ou des biopsies entières entre les groupes contrôles et stimulés (Figure A)



**Figure A :** Comparaison de la variation de l'expression des ARNm des protéines de jonctions ZO-1, Claudine, Occludine entre les animaux témoins et stimulés (rt PCR). Les différences entre les groupes n'étaient pas significatives, tant pour ZO-1 ( $p : 0.75$ ,  $n=6$ ) que pour Claudine ( $p : 0.75$ ,  $n=6$ ) et occludine ( $p : 0.43$ ,  $n=6$ ).

## Analyse du niveau d'expression des protéines MLC/ MLCK en Western Blot

Nous n'avons pas retrouvé de modification du niveau d'expression de la MLC ou de la MLCK entre T0 et T3h, ni entre les groupes stimulés et contrôles après 3 heures de stimulation (Figure B).

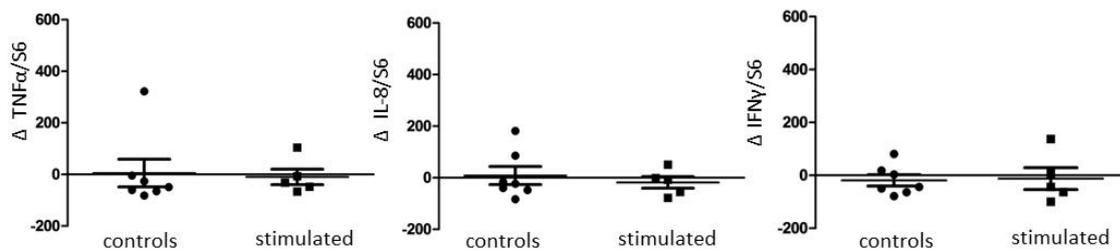


**Figure B :** Comparaison de la variation d'expression des protéines MLC et MLCK entre les groupes stimulés et témoins (Western Blot). La différence n'était pas significative : ( $p : 0.8$ ,  $n=6$  MLC ;  $p : 0.9$ ,  $n=6$  MLCK).

## Impact de la SRS sur les paramètres d'inflammation

En analyse histologique sur coupes montées colorées (Hémalun éosine), la densité de cellules immunitaires n'était pas différente entre les 2 groupes, au terme des 3 heures d'expérience. En revanche, l'analyse spécifique des sous populations a montré une diminution marginalement significative de la densité lymphocytaire chez les animaux témoins ( $p=0.07$ ), sans modifications dans le groupe stimulé.

L'étude de l'expression de transcrits de cytokines inflammatoires n'a pas montré de différence entre les 2 groupes, pour les molécules testées : IL-8,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ . Enfin, l'évaluation de la production de  $TNF\alpha$  sur des biopsies entières n'a pas montré de différences entre les groupes (Figure C).



**Figure C** : Comparaison de la variation d'expression des ARNm des cytokines proinflammatoires dans la muqueuse entre témoins et stimulés (rtPCR). Les différences n'étaient pas significatives pour le  $TNF\alpha$  ( $p : 0.75$ ,  $n=6$ ) pour IL-8 ( $p : 1.00$ ,  $n=6$ ) ou  $IFN\gamma$  ( $p : 1.00$ ,  $n=6$ ).

3. Standardisation de biopsies profondes pan-pariétales étagées du côlon pour étude de la BEI, et du SNE par voie endoscopique dans le modèle porcin

**Article n°2**

L'étude de l'impact de la SRS sur le long terme nécessite le développement parallèle d'approches permettant une étude longitudinale sur biopsies digestives. En effet, même si l'étude de l'impact sur le rectum peut être faite par biopsies transanales, l'effet de la SRS plus en amont sur le côlon nécessite une approche plus invasive soit par laparotomie soit par laparoscopie. Néanmoins, le développement chez l'homme des techniques endoscopiques en particulier des biopsies profondes pourrait représenter une alternative intéressante. Une telle approche déjà validée chez le porc au niveau de l'antrum gastrique n'a pas été évaluée au niveau du côlon. Aussi l'objectif de cette étude a été de valider la faisabilité de ces méthodes endoscopiques de biopsies profondes, pour caractériser les paramètres neuro-fonctionnels tel que la perméabilité para-cellulaire ; la transmission neuromusculaire et le phénotype neurochimique. Dans cette étude complémentaire de ma thèse, j'ai contribué à la conception du protocole ainsi qu'à la mise en place des expérimentations chez l'animal, en particulier pour la réalisation des procédures chirurgicales qui contrôlaient l'innocuité de la technique.

### **Design de l'étude**

Six animaux ont été utilisés pour cette étude. Sous anesthésie générale, après une préparation colique antérograde effectuée par introduction d'un cathéter 6.5 Fr au niveau du côlon 40 cm en amont par laparotomie, les animaux étaient ensuite soumis à des biopsies étagées systématiques par voie endoscopique (25, 30, 35 cm de la marge anale). La biopsie en paroi totale du côlon était effectuée grâce au procédé Duette (Cook medical). La fermeture de paroi colique après biopsie était réalisée par introduction d'une ligature élastique dans le dispositif de clip type OVESCO\*. L'étanchéité de la suture était vérifiée par un test au bleu, avec contrôle par laparotomie de l'absence de fuite de colorant en intrapéritonéal avant un sacrifice des animaux.

Les prélèvements ont fait l'objet d'un traitement systématique comprenant d'abord une microdissection et étalement de la muqueuse sousmuqueuse d'une part et de la musculature d'autre part. La partie musculature a fait l'objet d'une microdissection complémentaire, avec extraction de la

couche musculaire circulaire, puis une partie de la musculature longitudinale pour obtenir sur lame montée le plexus myentérique de façon aussi isolé que possible. Par analyse par immunohistochimie (marquage AF220), nous avons pu ensuite quantifier la concentration des ganglions du plexus myentérique. Dans un second temps, une analyse fonctionnelle ex-vivo de la transmission neuro-musculaire a été effectuée.

Cette étude a fait l'objet d'une publication, elle a démontré la faisabilité des biopsies coliques endoscopiques en paroi épaisse, et surtout, la validité d'une étude du plexus myentérique en plus des propriétés de la muqueuse et du système nerveux entérique sous muqueux.

**Conclusion :**

Dans ce contexte, nous avons mis au point et validé par notre modèle préclinique la réalisation de biopsies coliques étagées par technique endoscopique, par lesquelles il était possible d'effectuer une évaluation de la perméabilité para-cellulaire (figure annexe à l'article), une exploration du SNE, ainsi qu'une évaluation de la transmission neuro-musculaire. En revanche, dans notre étude, le taux d'étanchéité après fermeture par le dispositif dédié a été de 50%, ce qui reste encore un taux insuffisant, à augmenter avant de proposer de façon régulière ces modalités de prélèvement en pratique clinique.

## Article 2

Gastrointest Endosc. 2011 May;73(5):1029-34.

Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission.

Neunlist M, Coquenlorge S, Aubert P, Duchalais-Dassonneville E, des Varannes SB, **Meurette G**, Coron E.

## Colonic endoscopic full-thickness biopsies: from the neuropathological analysis of the myenteric plexus to the functional study of neuromuscular transmission

Michel Neunlist, PhD, Sabrina Coquenlorge, BS, Philippe Aubert, MS, Emilie Duchalais-Dassonneville, MS, Stanislas Bruley des Varannes, MD, PhD, Guillaume Meurette, MD, Emmanuel Coron, MD, PhD

Nantes, France

**Background:** Better understanding of the pathophysiological mechanisms involved in severe dysmotility disorders is crucial to improve patient management and identify novel therapeutic targets. Recent studies suggested that endoscopic full-thickness biopsies (eFTBs) could be developed as an alternative to surgical biopsies. However, currently it remains unknown whether eFTBs would allow myenteric plexus analysis on whole mounts and the evaluation of neuromuscular transmission.

**Objective:** To determine with eFTB specimens the ability to analyze on whole mounts the key parameters of the myenteric plexus, ie, ganglia and neurons, and to perform functional evaluation of neuromuscular transmission.

**Design:** An experimental pilot study in 6 pigs was conducted in accordance with French institutional guidelines.

**Intervention:** Under general anesthesia, pigs underwent a rectosigmoidoscopy. In each pig, an eFTB was performed at 25, 30, and 35 cm from the anal margin with an EMR-based technique. Tissue specimens were immediately processed for immunohistochemical and/or functional ex vivo analysis of neuromuscular transmission. In 2 pigs, over-the-scope clips were used to seal the perforation.

**Main Outcome Measurements:** Feasibility of obtaining specimens containing myenteric plexus and muscularis propria, quantitative and standardized immunohistochemical evaluation of ganglia and myenteric neurons, ex vivo assessment of neuromuscular transmission and its pharmacology, and closure rate (ancillary study).

**Results:** Adequate tissue specimens were obtained in 100% of the procedures, on average, in  $6 \pm 2$  minutes. Immunohistochemical analysis of a whole mount of the myenteric plexus showed that each eFTB contained  $14 \pm 5$  ganglia and  $1562 \pm 1066$  myenteric neurons. In circular muscle strips, electrical field stimulation or exposure to a pharmacological agent induced a specific tissue response. A successful closure was achieved in 50% of cases.

**Limitations:** Nonsurvival study; safety of the procedure needs to be specifically assessed and compared with recently published data.

**Conclusions:** We demonstrate, for the first time, that full-thickness biopsy specimens obtained by using an endoscopic approach allow the performance of a precise study of the ENS phenotype on whole mounts of the myenteric plexus and the performance of functional studies such as evaluation of neuromuscular transmission. However, further studies are warranted to identify the optimal and safest endoscopic procedure before application of eFTB in humans. (Gastrointest Endosc 2011;73:1029-34.)

*Abbreviations:* EFS, electrical field stimulation; eFTB, endoscopic full-thickness biopsy; ENS, enteric nervous system; GINMD, GI neuromuscular disease; OTSC, over-the-scope clips.

*DISCLOSURE:* Dr. Neunlist is recipient of a Contrat d'Interface Inserm. The authors disclosed no financial relationships relevant to this publication.

Copyright © 2011 by the American Society for Gastrointestinal Endoscopy 0016-5107/\$36.00

doi:10.1016/j.gie.2011.01.041

Received October 8, 2010. Accepted January 17, 2011.

Current affiliations: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U913, Université de Nantes Faculté des Sciences et Techniques, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU de Nantes, Nantes, France.

Reprint requests: Emmanuel Coron, MD, PhD, INSERM U913, CHU Hôtel Dieu, 1, place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes, France.

GI neuromuscular diseases (GINMDs) are a heterogeneous group of dysmotility disorders that include achalasia, gastroparesis, chronic intestinal pseudo-obstruction and slow transit constipation.<sup>1,2</sup> Most GINMDs are associated with dysfunctions of key cellular components of the gut, ie, the enteric nervous system (ENS), interstitial cells of Cajal, muscle cells, or even immune cells.<sup>3</sup> However, in humans, both diagnostic aspects and pathophysiological mechanisms involved remain poorly established, mainly because of the lack of both quantitative normative histopathological data on ENS lesions and functional assessment of neuromuscular transmission. A recent consensus report highlighted the urgent need to use a standardized access to tissues and evaluation methods of the ENS.<sup>2</sup>

There is growing evidence that full-thickness biopsy specimens may be the material of choice in assessing neuromuscular dysfunctions in severe GINMDs.<sup>4</sup> Although surgery is the method of reference to obtain full-thickness biopsy specimens, several novel endoscopic techniques might be used as alternatives,<sup>5-9</sup> including EMR-based techniques.<sup>7-9</sup> Full-thickness EMR techniques have been mainly used to remove GI tumors<sup>7,8</sup> but also in 1 study to access the ENS in the stomach. Indeed, Rajan et al<sup>9</sup> established proof-of-concept of performing a no-hole double EMR technique to access to the myenteric plexus in the stomach of a porcine model at the cost of a high rate of delayed perforation. However, this study did not address the issue of whether endoscopic full-thickness biopsy (eFTB) could allow both an analysis of the ENS phenotype by using whole mounts and a functional study of neuromuscular transmission. Further suggesting the potential use of the endoscopic full-thickness resection technique, both as a diagnostic and therapeutic tool, are the recent data obtained in patients managed conservatively by standard endoclips for bowel perforations<sup>10,11</sup> as well as the recent development of novel clipping and suturing devices for natural orifice transluminal endoscopic surgery.<sup>10-15</sup>

Therefore, the aims of our study were to establish that EMR-derived eFTB specimens allow (1) the characterization of whole-mount key parameters of the ENS, ie, ganglion and neuronal density, and (2) to perform *ex vivo* functional evaluation of neuromuscular transmission.

## METHODS

The research was conducted by using 6 Gall KO pigs (5 males; average weight 50 kg) in compliance with the French institutional guidelines. These procedures were approved by the local institutional animal research committee (Agreement E. 44010; Inserm, Nantes, France). General anesthesia was induced and maintained with 2% to 5% isoflurane (Abbott, Rungis, France). Surgically assisted antegrade colonic lavage was performed by water enema through a 6.5F catheter placed at 40 cm of the anal margin before the endoscopic procedure.

### Take-home Message

- With further studies identifying the ancillary steps for the safest endoscopic procedure, endoscopic full-thickness biopsy could be easily used in humans in well-defined clinical research settings.

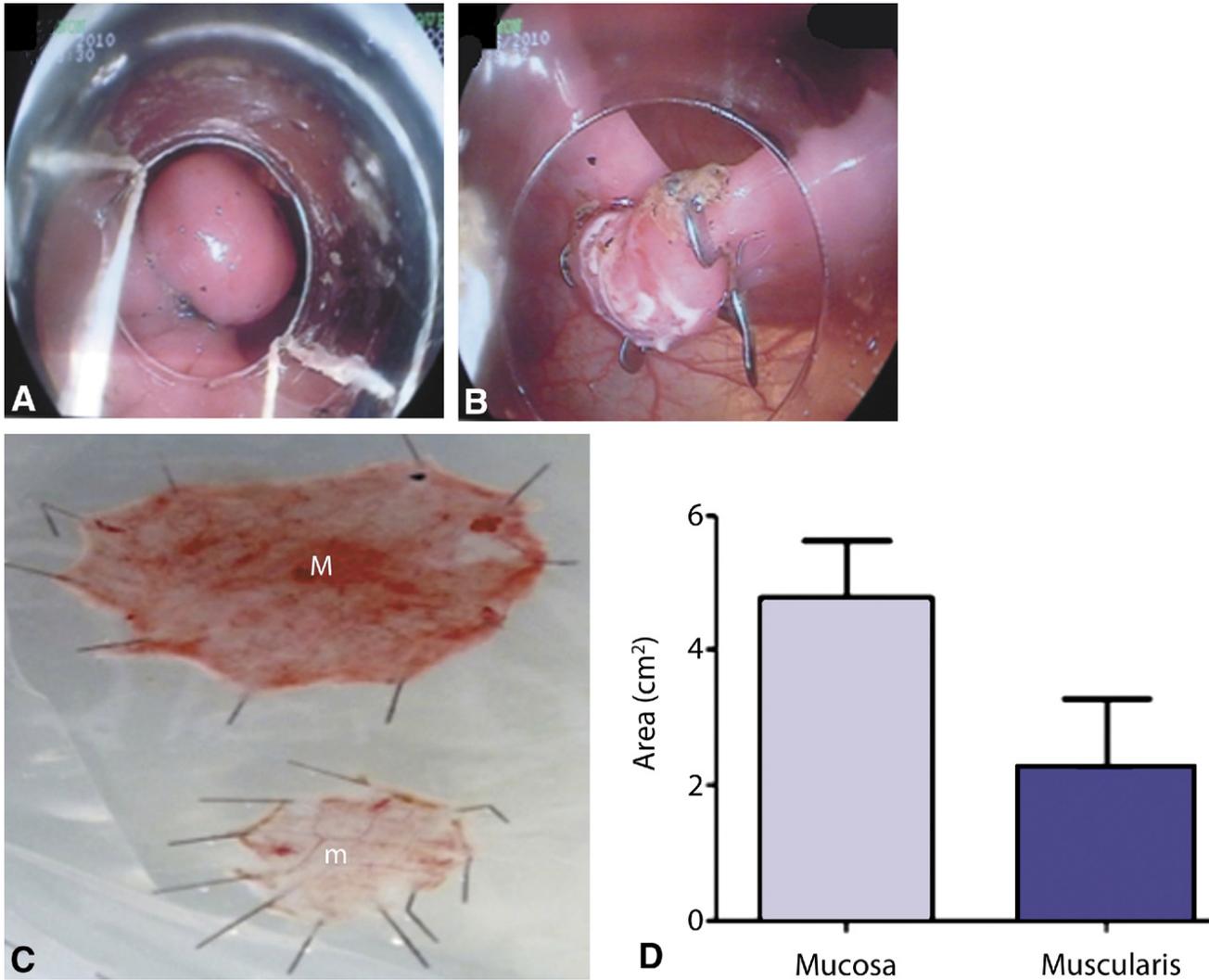
### eFTB technique

A rectosigmoidoscopy was performed in live pigs with a standard endoscope (EG450; Fujinon, Saitama, Japan). Three eFTBs were performed in each animal at 25, 30, and 35 cm from the anal margin with the Duette device (Cook Medical, Winston-Salem, NC). We used an EMR ligation technique, previously described in the esophagus,<sup>16</sup> and applied it to the colon as follows: the colonic wall was suctioned into a ligation cap without previous submucosal injection, and then a single rubber band was deployed at the base to create a panparietal pseudopolyp, which was subsequently removed by a snare placed below the band. In a subgroup of 2 pigs, a 12-mm OTSC (Ovesco Endoscopy, Tübingen, Germany) was placed at the resection site to close the defect (Fig. 1A, B). The Duette mucosectomy device was removed and replaced by the OTSC on the tip of the same endoscope. The full-thickness biopsy site was visualized endoscopically, and tissue approximation was performed by using a new prototype of grasping forceps (Wilson Instruments Co, Shanghai, China). The grasping forceps were then retrieved into the cap, suction was applied, and the OTSC was deployed. Technical success of closure was judged by the air and methylene blue leakage test under laparotomy evaluation, with the colon being submerged in saline solution. Animals were euthanatized at the end of the endoscopic procedure.

### Processing of tissue samples

Each resected specimen was dissected under a binocular microscope to obtain 2 tissue fragments: 1 containing the mucosa and the other composed of the muscularis (containing the myenteric plexus).

**Morphological and immunohistochemical analysis.** The 2 segments (muscularis and mucosa) were stretched in a Sylgard-coated Petri dish and fixed for 4 to 6 hours in paraformaldehyde at room temperature. Before microdissection, the surface areas of the stretched muscularis and mucosa specimens were determined by using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Md). Then, under a dissection microscope, the circular muscle and part of the longitudinal muscle were removed from the muscularis to obtain whole mounts of the myenteric plexus. Immunostaining of the whole mounts was performed according to standard methods<sup>17</sup> with antibodies against NF220 (1:500, AB1989; Millipore, Billerica, Mass) and Hu (1:200; Invitrogen, Breda, the Netherlands) for



**Figure 1.** Technique of endoscopic full-thickness biopsy (eFTB) and morphological evaluation of tissue samples. **A**, In the normal colon of the pig, a panparietal pseudopolyp is created by suction into a transparent cap, then resected and removed for tissue evaluation. **B**, An over-the-scope clip is placed at the resection site to close the defect. **C**, Following microdissection, muscularis (M) and mucosa (m) specimens are pinned in a Sylgard coated Petri dish. **D**, Surface area of all mucosa and muscularis specimens obtained from all endoscopic full thickness biopsies performed. The area of the mucosa was significantly larger as compared with the one of the muscularis propria. \**P* < .0001, n = 18.

identification of ganglionic structures and neurons, respectively. Whole mounts were then rinsed, placed on slides, covered with fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, Calif), and observed with a microscope IX 50 (Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan). Pictures were acquired with a digital camera DP71 (Olympus Medical Systems), connected to a computer through a frame grabber card (Cell B; Olympus Medical Systems).

**Ex vivo measurements of neuromuscular transmission.** Strips of circular muscle (approximately 5 × 10 mm) were dissected and placed in an organ chamber with 7 mL of Krebs solution at 37°C continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Strips were stretched with a preload of 10 mN, which was maintained during an equilibration period of 90 minutes. Then, strips were subjected to electrical field stimulation (EFS) by using previously described parameters<sup>18</sup> as follows: train du-

ration, 10 seconds; pulse frequency, 20 Hz; pulse duration, 300 μs; and pulse amplitude, 12 V. This procedure was repeated 2 to 3 times with 10-minute washout periods between stimulation. The contractile response of the muscle strip was continuously recorded by using isometric force transducers (No. 7005; Basile, Comerio, Italy), coupled to a PowerMac Performa 7100/80 computer equipped with the MacLab/4s System (ADI, Spechbach, Germany). At the end of each experiment, a dose-response curve with carbachol (10<sup>-11</sup>-10<sup>-4</sup> M) was performed. The EFS-induced response was evaluated by measuring the EFS-induced area under the curve during the EFS period and the area over the curve 1 minute after stimulation. The effects of carbachol were evaluated by measuring the area over the curve of the carbachol-induced contraction for 2 minutes after addi-

tion of carbachol. All values were normalized to the tissue weight.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Calif). Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The significance of differences was determined by using the 1-way analysis of variance for normally distributed data or the Mann-Whitney I test. Differences were considered statistically significant for  $P < .05$ .

## RESULTS

The technique of eFTB was successfully completed on all sites tested (100%,  $n = 18$ ). OTSCs were successfully placed to seal the perforation at 6 of 6 sites. However, air bubbles and/or methylene blue leakage were observed at 3 of 6 sites. Total time to perform a full-thickness biopsy (ie, from initial insertion to removal of the endoscope with the specimen) was  $6 \pm 2$  minutes per site ( $n = 18$ ). The total time of the closure procedure (ie, from the removal of the biopsy specimen to the removal of the endoscope after placement of the OTSCs) was  $4 \pm 2$  minutes per site ( $n = 6$ ).

### Morphological analysis of the eFTB specimens

The size of the mucosa specimen was significantly larger than the muscularis specimen (Fig. 1C, D). The size of the mucosa and muscularis specimens was independent of the location of the biopsies (data not shown).

### Immunohistochemical analysis

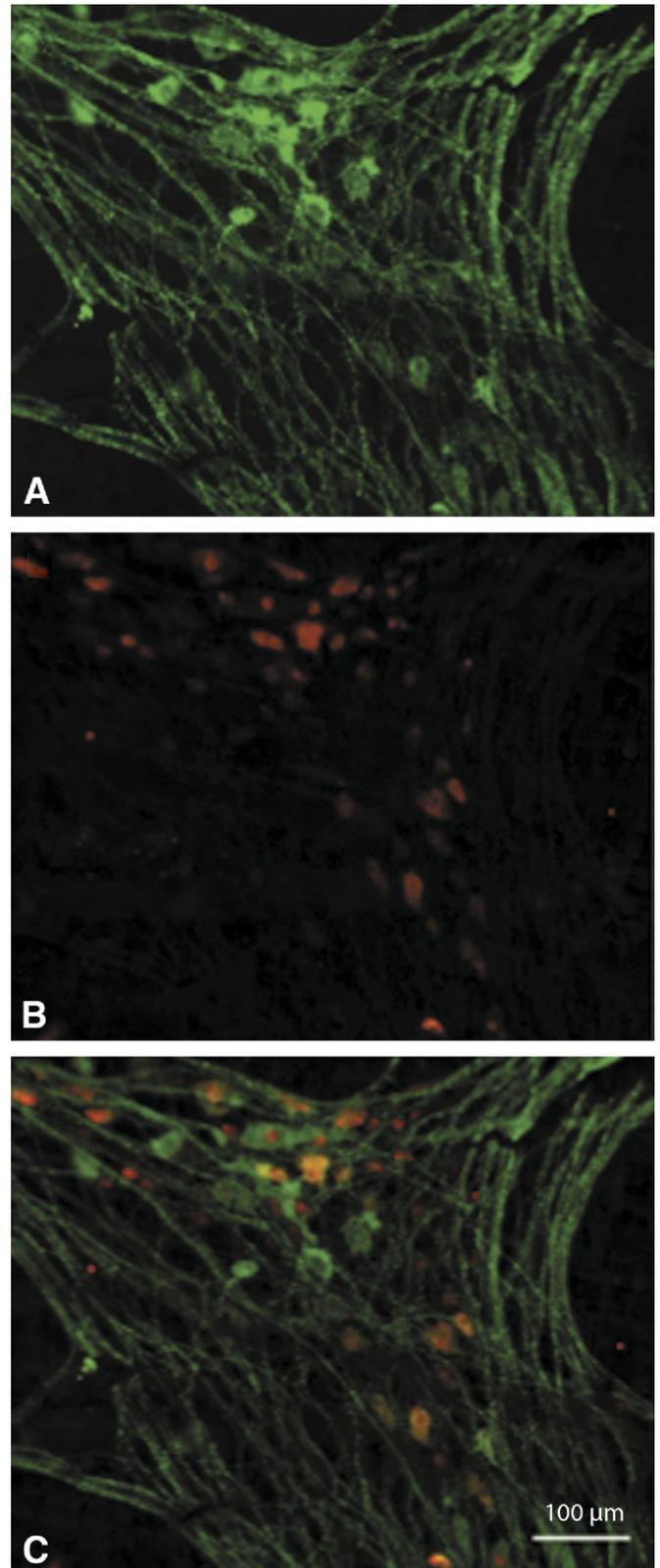
The size of the whole mounts of eFTB specimens (taken at 30 cm from the anal margin) was  $0.8 \pm 0.5$  cm<sup>2</sup> ( $n = 6$ ). For each biopsy specimen, NF220 staining revealed the presence of ganglia containing enteric neurons (Fig. 2). The number of ganglia per biopsy was  $14 \pm 5$ , and each ganglia contained  $40 \pm 11$  Hu-immunoreactive neurons ( $n = 6$ ). The total number of neurons per biopsy (contained within ganglia and also within interganglionic fiber strands) was  $1562 \pm 1066$  ( $n = 6$ ). The individual values of each parameter evaluated are presented in Table 1.

### Neuromuscular transmission assessment

All circular muscle strips exhibited spontaneous contraction at baseline. Furthermore, EFS induced a biphasic contractile response characterized by relaxation during the EFS followed by a contractile response after the EFS (Fig. 3A, B). In addition, carbachol induced a dose-dependent increase in muscle contraction (Fig. 3C, D).

## DISCUSSION

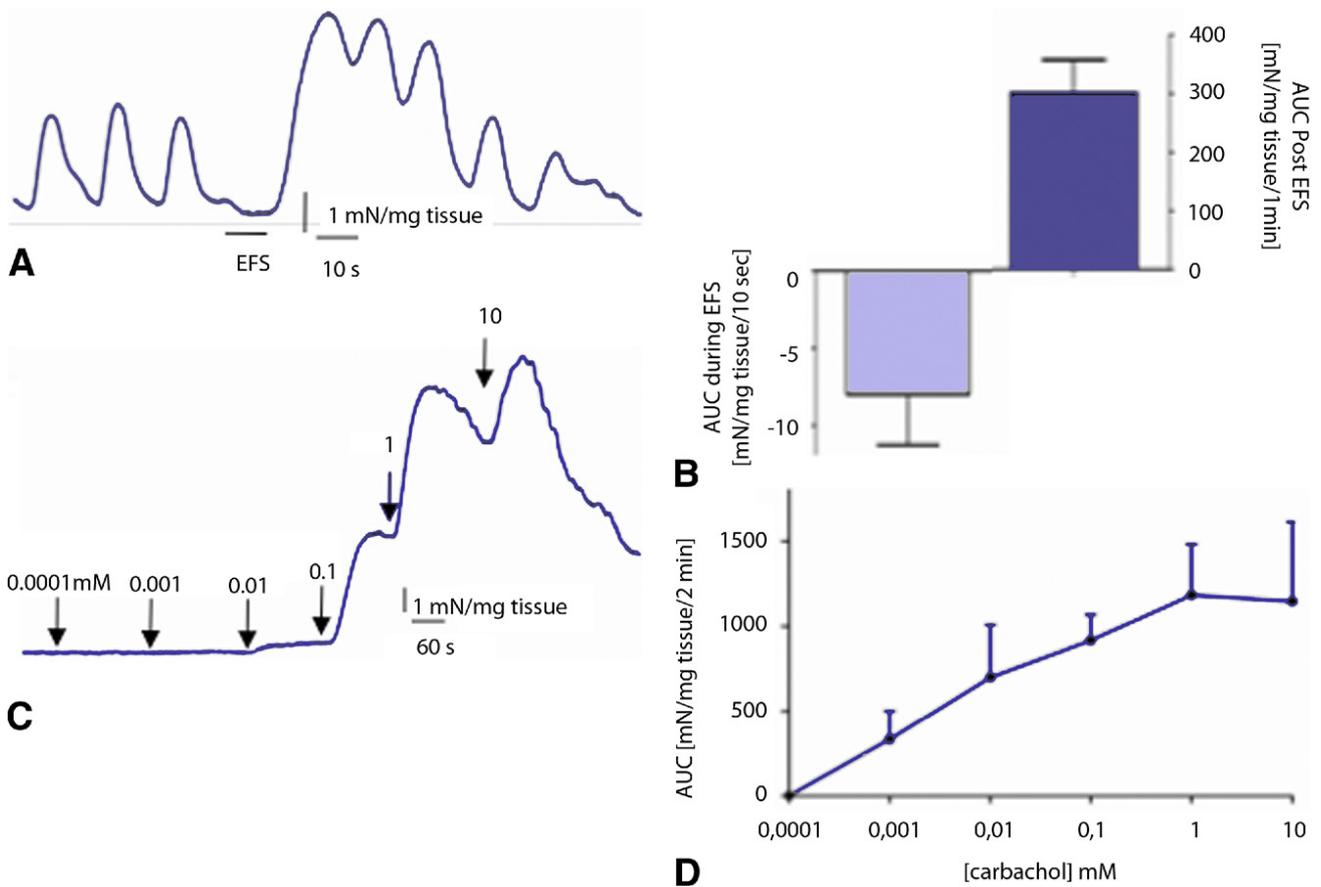
This study established, for the first time, that eFTB allows a precise study of ENS phenotype on whole mounts of myenteric plexus to be performed and func-



**Figure 2.** Photomicrograph of colonic myenteric plexus and neurons obtained in whole mounts preparations from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB). **A**, Myenteric ganglia were identified with anti-NF220 antibody and contained **(B)** Hu-immunoreactive (IR) neurons. **C**, Merged images of NF 220-IR and Hu-IR structures (scale bar, 100  $\mu$ m;  $n = 6$ ).

**Table 1. Neuropathological characteristics of pig colonic myenteric plexus obtained from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB).**

Parameters	Pig 1	Pig 2	Pig 3	Pig 4	Pig 5	Pig 6	Mean (SD)
Whole mount area (cm <sup>2</sup> )	0.46	0.77	1.21	0.22	0.68	1.51	0.81 (0.48)
Neurons/eFTB	604	1209	2180	348	1817	3212	1562 (1066)
Ganglia/eFTB	12	13	16	6	17	19	14 (5)
Neurons/ganglia	23	51	42	32	50	43	40 (11)
Neuronal density (/cm <sup>2</sup> )	1313	1570	1802	1582	2672	2127	1844 (489)
Ganglia density (/cm <sup>2</sup> )	26	17	13	27	25	13	20 (7)



**Figure 3.** Measure of contractile activity in isolated segments of colon obtained from endoscopic full-thickness biopsy (eFTB). **A**, Typical recording showing muscular relaxation during electrical field stimulation (EFS) followed by a contractile off response. **B**, Quantitative assessment of muscular response during EFS stimulation (10 sec) and for 1 minute after stimulation reported by area under the curve (AUC). **C**, Typical recording of carbachol dose-response stimulation of contraction in circular muscle strip. **D**, Quantitative assessment of muscular response following carbachol administration, measured for 2 minutes after stimulation showed by AUC (n = 3).

tional studies such as evaluation of neuromuscular transmission to be performed. However, closure of the EMR-induced perforation was achieved successfully in 3 of 6 cases (ancillary study).

An important aspect of this study is the ability to obtain specimens of sufficient size to allow a precise neuropathological characterization of the myenteric plexus in the distal colon. In particular, the size of the

muscularis (2.1 cm<sup>2</sup>), before microdissection, is similar to that recommended by the London classification (2.3 cm<sup>2</sup>).<sup>2</sup>

Second, our study demonstrates that the microdissection of a single eFTB specimen allows whole mounts of myenteric plexus to be obtained. This step is necessary to perform a comprehensive and quantitative study of the phenotype of the myenteric plexus. The neuronal density or number of

neurons per ganglia appears high, although no previous report analyzed these parameters in the pig colon. Our results also support the feasibility of performing precise neurochemical coding of a single eFTB specimen. Indeed, because a large number of neurons are available per whole mount (ie, 1500), dividing them into pieces would allow multiple staining of various neuronal or glial mediators of interest. Third, our study also shows the possibility of characterizing both neuromuscular transmission and pharmacological studies on muscle strips obtained by eFTB. Indeed, we showed in the circular muscle of the pig colon that EFS induced a relaxation followed by a rebound contraction and carbachol induced a dose-response contraction. In addition, studying both neuromuscular transmission and circular and/or longitudinal muscle response to various agonists might help to better differentiate between neurons and muscular lesions, in particular in GINMDs.

An important limitation to this study was the lack of sufficient safety data, although this was not a primary endpoint. Indeed, we reported a successful closure rate of 50%, which could be a major concern for the safety of an eFTB procedure. These results were obtained in a small number of experiments without taking into account the learning curve for placing OTSCs. However, von Renteln et al<sup>6</sup> reported a similar closure rate with OTSCs after full-thickness resection. Nevertheless, in a second group of animals, the authors improved their results to a closure rate of 100% by combining an endoloop with the OTSC to approximate the margins before the resection. These results might suggest better safety with a no-hole prophylactic approach, as previously used by Rajan et al.<sup>9</sup> However, recent studies assessing the closure of natural orifice transluminal endoscopic surgery access sites demonstrated similar efficacy and safety between surgical repair and endoscopic novel clipping or suturing devices.<sup>12-15</sup> With further studies identifying the ancillary steps for the safest endoscopic procedure, eFTB could be easily used in humans in well-defined clinical research settings.<sup>19</sup>

In conclusion, our study highlights the diversity of functional and morphological analysis that can be performed with eFTB specimens obtained in the pig colon. The combination of these approaches could be used to answer major unmet needs concerning the development of novel diagnostic and therapeutic targets for GINMDs.

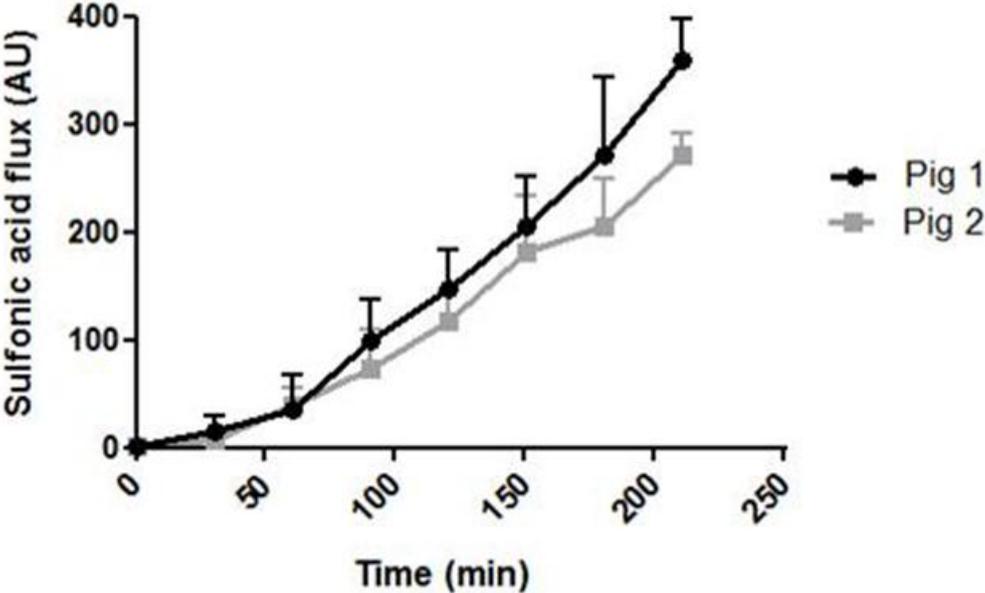
## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. J.P. Galmiche for his helpful criticisms and review of the manuscript and are grateful to Prof. Gilles Blanche, David Minault, and Jeremy Hervouet from the large animal facility at the Institute of Transplantation-Urology-Nephrology (ITUN)/Inserm U643.

## REFERENCES

1. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009;118:271-301.
2. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010;59:882-7.
3. Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, et al. Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:25-42.
4. Knowles CH, Veress B, Tornblom H, et al. Safety and diagnostic yield of laparoscopically assisted full-thickness bowel biopsy. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:774-9.
5. Fraser H, Neshev E, Storr M, et al. A novel method of full-thickness gastric biopsy via a percutaneous, endoscopically assisted transenteric approach. *Gastrointest Endosc* 2010;71:813-4.
6. Von Renteln D, Schmidt A, Vassiliou MC, et al. Endoscopic full-thickness resection and defect closure in the colon. *Gastrointest Endosc* 2010;71:1267-73.
7. Von Renteln D, Schmidt A, Riecken B, et al. Gastric full-thickness suturing during EMR and for treatment of gastric-wall defects (with video). *Gastrointest Endosc* 2008;67:738-44.
8. Agrawal D, Chak A, Champagne BJ, et al. Endoscopic mucosal resection with full-thickness closure for difficult polyps: a prospective clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2010;71:1082-8.
9. Rajan E, Gostout CJ, Lurken MS, et al. Endoscopic "no hole" full-thickness biopsy of the stomach to detect myenteric ganglia. *Gastrointest Endosc* 2008;68:301-7.
10. Magdeburg R, Collet P, Post S, et al. Endoclippping of iatrogenic colonic perforation to avoid surgery. *Surg Endosc* 2008;22:1500-4.
11. Yang DH, Byeon JS, Lee KH, et al. Is endoscopic closure with clips effective for both diagnostic and therapeutic colonoscopy-associated bowel perforation? *Surg Endosc* 2010;24:1177-85.
12. von Renteln D, Rudolph HU, Schmidt A, et al. Endoscopic closure of duodenal perforations by using an over-the-scope clip: a randomized, controlled porcine study. *Gastrointest Endosc* 2010;71:131-8.
13. von Renteln D, Schmidt A, Vassiliou MC, et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery gastrotomy closure with an over-the-scope clip: a randomized, controlled porcine study (with videos). *Gastrointest Endosc* 2009;70:732-9.
14. Moran EA, Gostout CJ, McConico AL, et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery used for perforated viscus repair is feasible using lower peritoneal pressures than laparoscopy in a porcine model. *J Am Coll Surg* 2010;210:474-9.
15. Park PO, Bergström M, Rothstein R, et al. Endoscopic sutured closure of a gastric natural orifice transluminal endoscopic surgery access gastrotomy compared with open surgical closure in a porcine model. A randomized, multicenter controlled trial. *Endoscopy* 2010;42:311-7.
16. Soehendra N, Seewald S, Groth S, et al. Use of modified multiband ligator facilitates circumferential EMR in Barrett's esophagus (with video). *Gastrointest Endosc* 2006;63:847-52.
17. Lin Z, Gao N, Hu HZ, et al. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:197-204.
18. Bruley des Varannes S, Chevalier J, Pimont S, et al. Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus. *Gut* 2006;55:319-26.
19. Leung FW. Double-EMR-derived full-thickness biopsy and functional GI disorders. *Gastrointest Endosc* 2008;67:304-6.

Figure annexe : Evaluation de la perméabilité para-cellulaire de la BEI à partir de biopsies coliques effectuées par voie endoscopique.



**Figure: Measure of *ex vivo* paracellular permeability across mucosa obtained from full thickness biopsy.** The flux of sulfonic acid across mucosa segments obtained from full thickness biopsies was measured over time in Ussing chamber (expressed in arbitrary unit (AU) of fluorescence).

4. Développement du modèle chronique de SRS avec évaluation des effets sur la Barrière épithéliale du rectum en termes de perméabilité, d'expression des protéines de jonction, de réponse inflammatoire locale et systémique et de transmission neuro-musculaire

**Article n°3 (en soumission)**

A partir des résultats encourageants obtenus lors de la première publication, et notamment le renforcement de la BEI sous l'effet de la SRS à court terme, nous avons voulu évaluer les effets à plus long terme. Pour réaliser cette étude complémentaire, nous avons eu recours au modèle de SRS chronique, avec implantation du boîtier définitif de stimulation. La durée de stimulation était de 7 jours. Ce délai nous paraissait être idéal pour mettre en évidence des mécanismes adaptatifs de la BEI et notamment posttranscriptionnels sous l'effet de la SRS. Ce délai est également la durée minimale de test pour juger de l'efficacité de la SRS en pratique, même si pour la pathologie digestive, une durée de 3 semaines est plus fréquemment utilisée en routine. Compte-tenu des résultats plus significatifs obtenus avec une stimulation bilatérale dans notre première publication, nous avons décidé de réaliser une stimulation bilatérale systématique dans un premier temps pour évaluer la SRS à long terme.

### **Design de l'étude**

Dans cette partie, nous avons utilisé 14 animaux. 7 porcs recevaient une stimulation bilatérale, 7 porcs recevaient l'implantation des stimulateurs, sans stimulation. Sous anesthésie générale, les animaux étaient soumis à une première biopsie panariétale du rectum par voie transanale. La mise en place de la SRS se faisait ensuite. Les animaux étaient ensuite remis en box, avec un suivi pluriquotidien des constantes, de l'alimentation, du comportement. Après 7 jours de stimulation, les animaux étaient anesthésiés à nouveau, pour réalisation d'une seconde biopsie, à distance de la première (3 cm) mais aussi au niveau de la cicatrice. La stimulation était vérifiée en éteignant et rallumant les pace makers, puis le matériel retiré et stérilisé. Les animaux étaient alors sacrifiés en fin de procédure.

### **Résultats de l'étude**

Cette étude a montré que la perméabilité para-cellulaire n'était cette fois pas modifiée après 7 jours de stimulation, par rapport au groupe contrôle. De même, il n'y avait pas de modifications d'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse. En revanche, on retrouvait une absence d'augmentation de la perméabilité para-cellulaire sous l'effet de ligand PAR2 ex-vivo, ainsi que l'absence de diminution de l'expression des protéines de jonctions (ZO-1) dans la muqueuse, sous

l'effet de la SRS. Enfin, dans un modèle de stress ischémique, en culture organotypique, nous avons mis en évidence une diminution de la sécrétion d'IL-6 chez les animaux stimulés.

Ces résultats témoignent d'une absence de modification basale de la BEI, mais d'une diminution de la sensibilité aux agents stressseurs, ce qui va dans le sens d'un renforcement de la BEI par la SRS.

**Article 3 (soumission)**

**Effects of chronic Sacral Nerve Stimulation upon intestinal epithelial barrier of the rectum and neuromuscular transmission in a porcine model**

**Guillaume Meurette**<sup>1</sup>, Marie Provost<sup>1</sup>, Philippe Aubert<sup>1</sup>, Emilie Duchalais-Dassonneville<sup>1</sup>, Emilie D'Alembert<sup>2</sup>, Nathalie Vergnolle<sup>2</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM-UMR 913, Institut des maladies de l'appareil digestif. CHU Nantes Hôte-Dieu 44093 Nantes

Article 3

**Effects of chronic Sacral Nerve Stimulation upon intestinal epithelial barrier of the rectum and neuromuscular transmission in a porcine model**

Guillaume Meurette, Marie Provost, Philippe Aubert, Emilie Duchalais-Dassonneville, Michel Neunlist

INSERM-UMR 913, Institut des maladies de l'appareil digestif. CHU Nantes Hôte-Dieu 44093 Nantes

**Corresponding author:** [guillaume.meurette@chu-nantes.fr](mailto:guillaume.meurette@chu-nantes.fr)

## **Abstract**

**Introduction:** Sacral nerve stimulation (SNS) is a validated treatment option for fecal incontinence but the mechanisms of action remains currently unknown. Short-term effects of SNS upon the intestinal epithelial barrier have been reported previously. The aim of our study has been to assess the impact of a long-term period of SNS (7 days) upon the intestinal epithelial barrier in a preclinical model.

**Methods:** 14 pigs were implanted for bilateral SNS. Seven received 7 days-period stimulation, whereas the remaining animals didn't receive stimulation. Rectal biopsies were performed before and after 7 days. Assessment of intestinal barrier permeability, mucosal tight junctions and cytokine mRNA expressions, IL-6 production in an organotypic culture model and ex-vivo neuromuscular transmission on muscle strips.

**Results:** SNS was uneventful in all animals. IEB permeability was not modified after stimulation as compared to baseline. Nevertheless, SNS avoided increasing of permeability after agonist PAR2 adjonction, and avoided decrease of ZO-1 mRNA expression into the mucosa. No overexpression of cytokine was noted into the mucosa, whereas SNS decreased IL-6 production in the organotypic culture model. Finally, neuromuscular transmission was modified by SNS leading to neuronal hyperexcitability

**Conclusion:** Despite no changes assessed into physiologic conditions, chronic SNS have modified IEB properties, leading to a trend in decrease in its permeability under stress-induced conditions. These results add evidences to the reinforcement of IEB by SNS.

**Key words** Intestinal epithelial barrier / Sacral nerve stimulation / Animal model

## **Introduction**

Sacral nerve stimulation (SNS) is a validated treatment option for fecal incontinence (1,2). Over the past decade, indications for SNS have been expanded to several other GI dysfunctions. Firstly, SNS has been shown to improve constipation (ie slow transit constipation and evacuatory disorders)(2). In addition, preliminary reports also suggest that SNS could improve pelvic pain (3) and could alleviate symptoms in IBS patients (4). Finally, SNS could also hypothetically have some effects during inflammatory bowel diseases. Indeed, Vitton et al. (5) based on their study in treating 8 patients with anoperineal Crohn's disease with fecal incontinence have shown that SNS could improve continence and patient's comfort. However, no specific assessment of disease activity has been performed in this study. Therefore, besides modulating rectal and/or colonic motor functions, SNS could also affect other important parameters involved in the maintenance of gut homeostasis, particularly intestinal epithelial barrier (IEB). The IEB is a monolayer of epithelial cells under constant renewal and maintained by specialized junctions (6). Gut barrier functions allow the passage of nutrients/electrolytes and concurrently control the passage of pathogens. Barrier functions are tightly regulated by cellular components of its microenvironment such as immune cells, bacteria and also the extrinsic and enteric nervous system (7–10). Indeed, several studies have shown that chronic electrical stimulation of the vagus nerve or the ENS reduced paracellular permeability (11,12). Furthermore, in a previous study we have shown that SNS reduced paracellular permeability, increased mucus secretion after a short-term period of stimulation (3h)(13). This study also showed that bilateral stimulation was more effective than unilateral at reducing paracellular permeability. However whether these short-term effects of SNS are sustained during chronic stimulation remains currently unknown. Whether such changes remain over long term is a pertinent question as paracellular permeability can be regulated by different mechanisms that differ between short-term and long-term periods. Indeed, paracellular permeability can be regulated within minutes to hours by post-translational modifications such as phosphorylations of key molecules involved in permeability such as MLC or ZO-1 (14,15). Conversely long-term mediation of permeability may involve additional transcriptional regulations of tight junctions associated proteins such as ZO-1, ZO-2 or claudin family proteins

Besides improvement of our understanding of the mechanism of action of SNS, the assessment of SNS efficacy after long-term stimulation might also be of interest for clinical applications, in particular to better identify responding vs non-responding patients. Indeed, among patients treated for fecal incontinence by SNS, 10 to 30% will experience after initial improvement a reduction of its efficacy with time (16,17). Unfortunately, no predictive factors of success are available in the literature (18). The ability to address this specific issue relies on the ability of relevant preclinical animal models of SNS. In this context, the pig might represent such an ideal model that could allow us to identify novel predictive biomarkers of SNS efficacy. Indeed, rectal/sphincter anatomy and extrinsic nerve distribution is similar to that of human (19,20). In addition, we have recently shown that SNS can be performed using similar approaches that in human with percutaneous sacral root stimulation. However it is currently unknown whether long term implantation of SNS can be performed.

Altogether aims of our study were first, to develop and model of long-term SNS using implantable electrodes and stimulators, and second, to assess the impact of chronic SNS (ie 7days) upon key intestinal barrier parameters.

## **Material and Methods**

### **Bilateral Chronic sacral nerve stimulation (SNS) in pigs**

A total of 14 pigs (6-months old and average weight 30Kgs) have been included in this study. Experiments were performed into a dedicated surgical facility of Research Lab : LGA (Laboratoire des Grands Animaux, INSERM U 643) in accordance with French Veterinary Regulations and Ethics Committee standards (Agreement : E 44010). Animals were operated on under general anesthesia in a right lateral position (induction IsoFluran 5% and Nitrous Oxyde 60%, thereafter maintained with 2% Isofluran infusion). Animals underwent a full thickness rectal biopsy transanally, with suture of the biopsy area before any stimulation was initiated. Bilateral SNS started for 7 animals after 30 min steady-state anesthesia as previously described. Briefly, percutaneous electrode placement (Medtronic 041828-004, Medtronic inc, Minneapolis, USA) was performed for selective S3 root stimulation. Once the optimal position was found with anal contraction, the second electrode was placed controlaterally and tested. Subsequently, pacemakers were connected to each electrode, and inserted subcutaneously into lombar area and wounds were sutured. Pacemakers were switched on using dedicated remote control immediatly after the surgical procedure. The minimal intensity (0.5 to 1.5V) for anal contraction was recorded and maintained in each animal for the study-period.

### **Design of the study**

At the beginning of the experiment, animals underwent a full thickness rectal biopsy 3 cm above the dentate line. The bilateral SNS was started in 7 animals whereas the 7 remaining underwent stimulator implantation but no stimulation (stimulator switched off). During the 7 days study-period, animals underwent normal diet and daily monitoring of the temperature, behaviour, nutrition, bowel movements and wound were assessed. At the end of the experiment, biopsies of the rectum were performed, into a safe area (controlaterally to the first biopsy) and into the previous wound suture (scar area). Stimulation was then interrupted and anal tone reported comparing the anal sphincter contraction with and without stimulation. Thereafter stimulators were removed and the animals were sacrificed with intravenous injection of phenobarbital.

### **Ex vivo assessment of paracellular permeability of the rectal barrier**

Each biopsy was immediately placed into ice cold Krebs solution and underwent processing and analysis. Each specimen has been micro-dissected to separate mucosa from submucosal layer (in the plane of submucosal blood vessels). Specimen of isolated rectal mucosa were then mounted in dedicated Ussing Chambers (Transcellab, TBC, Paris, France) exposing a mean surface of 0.0314 cm<sup>2</sup>. Each side of mounted specimen was bathed with 1.5 ml of Ham's Nutrient Mixture (HAM/F12 Invitrogen, France). The media was continuously oxygenated and maintained at 37°C by a gaz flow of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. After 30 min equilibration period, 150ul of Fluorescein-5.6 sulfonic acid (1 mg/ml, 400D, Invitrogen, France) was added. The fluorescence level of basolateral aliquots of 150 ul was measured every 30 min for a 180 min overall period using a fluorimeter (Varioskan, Thermo SA, France). Paracellular permeability was determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time using a linear regression fit model measured in the specimens (Graphpad Prism 5, La Jolla, USA). Subsequently, Paracellular permeability has been assessed after a 3 hour-period of incubation with agonist PAR-2 SLIGRL (100um) addition into the media for each condition.

### **Histological evaluation of the rectal mucosa after chronic SNS**

Specimen of mucosae were fixed into Paraformaldehyde (4% in PBS). After tissue washing in PBS, they were dehydrated and embedded in paraffin. Sequential sections of mucosa (5um) were performed. Both stimulated and control groups were analyzed by classical microscopy following haematoxylin-eosin staining, under Olympus IX 50 microscope (Olympus inc. Center Valley, PA, USA). Pictures were captured using digital camera DP71 (Olympus), connected to a computer through a frame grabber card (Cell B software, Olympus). Two parameters were analyzed to assess the mucosal morphology, as previously reported (13) : (i) mucosal thickness was determined by measuring the distance between the surface epithelium and the underlying muscularis mucosae ; and (ii) the height of the surface epithelium. The mean values were therefore computed on a total of 10 fields (3 values per field) examined per condition. Investigators were blinded for histological observations.

### **RT- Quantitative PCR**

Rectal biopsies total RNA were extracted from cells using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) columns according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed among the all purified RNA. RNA level was determined using Nanodrop software. Samples were processed to obtain 1µg d'ARN among a 15 µl final volume. Total RNA, pd(N)<sub>6</sub> random hexamers (1µl;265 ng/µl GE Healthcare, Orsay, France) dNTPs (1µl ;10mM; Gibco, Cergy-Pontoise France) were used to synthesise single-stranded cDNA using Superscript II Reverse Transcriptase (0.5µl,200U/µl;Invitrogen) according to manufacturer's instructions, in a total volume of 25µl. Incubation was performed at 42°C for 60 min. Amplification conditions for TNF $\alpha$ ,IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, ZO-1, Claudin 1 and S6 templates were optimized for the RotorGene 2000 device (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). PCRs were performed with 2µlcDNA, 0.1µl of a solution of SYBR Green I diluted 1:100 (Sigma); 1µl(10µM) of each primer; 1µl (10mM) dNTPs, and 0.4µlTitaniumTaq DNA Polymerase kit (Ozyme), according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows:5min at 95°C; amplification for 35 cycles with denaturation for 5 sec at 95°C;annealing 15s at 60°C, and extension 20s at 72°C. Primers were chosen on separate exons to amplify cDNA. The primers are presented in table 1. A standard curve was generated with serial dilutions of control cDNA by plotting the relative amounts of these dilutions against the corresponding Ct (Cycle treshold) values. The amount of each gene expression was calculated from these standard curves using RotorGene software (Ozyme). Samples were tested in triplicate, and the mean values were used for quantification using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method as previously described.

### **Organotypic culture model**

After microdissection, mucosal fragments were placed into a Petri dish. 10 ml of organotypic culture medium was added (Dulbecco's modified Eagle's Medium //F12 ; St Quentin Fallavier, France) supplemented with10% inactivated fetal calf serum, 2.1g.l-1 NaHCO<sub>3</sub>, glutamin and penicillin/streptomycin. The fragments were maintained for 6 hours at 37°C in humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> and air, on a rocking tray. At the end of the experiment, supernatants were removed and immediately stored at -80°C. Subsequently IL-6 protein level among the supernatants of

tissue culture was determined by ELISA technique (BD, France) according to the manufacturer's instruction. Every sample was assessed in duplicate.

### **Processing of biopsies from the scar area**

Specimens were microdissected and mucosa was separated from the submucosal layer as previously described. Mucosal fragments were separated into 2 groups: from the scar of previous biopsy itself (central group); and at a mean 1cm far from the scar (peripheral group), and placed into a Petri dish with 10 ml of culture medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium //F12 ; St Quentin Fallavier, France). The fragments were maintained for 1 hour at 37°C in humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> and air, on a rocking tray. At the end of the experiment, supernatants were removed and immediately stored at -80°C.

### **Ex vivo measurements of neuromuscular transmission**

Strips of circular muscle of 5x10 mm length were dissected and placed into organ chamber with 7 ml of Krebs's solution at 37°C continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Strips were stretched with a preload of 10 mN, which remained maintained during a 90-min equilibration period. Strips were then subjected to electrical field stimulation (EFS) following parameters previously described (Bruley gut 2006): train duration, 10s ; pulse frequency, 20Hz ; pulse duration, 300us ; and pulse amplitude : 12V. This procedure was repeated 2 to 3 times with 10 min wash-out period between stimulations. The contractile response of the muscle was assessed continuously using isometric force transducer (Nb 7005, Basile, Comerio, Italy) coupled to computer equipped with MacLAB/4S System (ADI Spechbach, Germany). Subsequently a dose-response curve with Carbachol ( $10^{-11}$ - $10^{-4}$  M) was performed. The EFS-induced response was evaluated by measuring the EFS-induced area under the curve during the EFS period and the area over the curve after 1 min stimulation. Effect of Carbachol was assessed by measuring the area over the curve of Carbachol-induced contraction 2 min after addition of Carbachol. The values were normalized to the tissue weight.

## **Results**

### **Chronic sacral nerve stimulation in pigs**

Fourteen pigs have been included in the study. Seven received successful bilateral SNS implantation, the remaining animals were fully implanted but not stimulated. Success of implantation was controlled on the anal contraction in every case. No complication occurred during or after the procedures. Indeed, all the animals experienced normal recovery and behaviour during the 7 days-period of experiment. At the end of the stimulation period, before stimulators were switched off, the sphincter assessment showed no visual evidence of contractions despite stimulation. Nevertheless, while stimulation was started after a short interruption period with the same parameters, ipsilateral anal contractions were present. During the study, the animals underwent a clinical monitoring of temperature, cardiac frequency and saturation. No modification has been observed during the study period in both groups. For every animal, local infection occurred into the pace maker insertion area but remained clinically not relevant.

Blood cell count increased with serum leucocytes and polynuclear neutrophiles cells into the control group ( $P=0.029$ ;  $p=0.001$ ), whereas no modifications was observed into the stimulated group ( $p=0.06$ ;  $p=0.1$ ).

### **Impact of chronic sacral nerve stimulation on paracellular permeability (Figure 1,2)**

At the beginning of experiment, paracellular permeability was similar in both groups. After 7 days of stimulation, permeability remained unchanged in both control ( $n=7$ ;  $p=0.68$ ) and stimulated animals ( $n=7$ ;  $p=0.93$ ) as compared the value measured at D0 (**Figure 1**).

At D0, After incubation of biopsies with SLIGRL (100 $\mu$ m) for 3 hours, paracellular permeability increased significantly in all the animals ( $n=14$ ;  $p=0.046$ ). At D7, SLIGRL tended to increase paracellular permeability in control animals ( $n=7$ ;  $p=0.06$ ). In contrast, SLIGRL was unable to change paracellular permeability in stimulated animals ( $n=7$ ;  $p=0.69$ ) (**Figure 2**).

### **Impact of chronic sacral nerve stimulation on mucosal histology (Figure 3)**

As compared to D0, thickness of the epithelium and the mucosa remained unchanged in both control and stimulated groups at D7. Epithelium thickness at D0 was  $3.8 \pm 1 \mu\text{m}$ . This value was similar to the one measured at D7 in the stimulated group  $3.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$  (ns) and in the control group,  $3.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$  (ns). Mucosal thickness at D7 was respectively  $43.8 \pm 35 \mu\text{m}$  and  $46.8 \pm 4 \mu\text{m}$  in stimulated and controls, as compared to  $45 \pm 18$  at D0 (ns).

#### **Impact of chronic sacral nerve stimulation upon tight junction protein mRNA expression in the rectal mucosa (Figure 4)**

ZO-1 mRNA expression decreased significantly at D7 in controls as compared to D0 ( $n=7$ ;  $p=0.03$ ). In the stimulated group, no significant decrease in ZO-1 mRNA expression was observed at D7 as compared to D0 ( $n=7$ ;  $p=0.25$ )(B). Claudin-1 mRNA expression did not differ between D0 and D7 in control ( $n=7$ ;  $p=0.5$ )(C) nor in stimulated group ( $n=7$ ;  $p=0.8$ )(D).

#### **Impact of chronic sacral nerve stimulation upon IL-6 secretion by mucosal fragments maintained in organotypic culture (Figure 5)**

In order to evaluate the putative effects of SNS upon mucosal inflammatory response, we maintained mucosal specimen in organotypic culture model. This model can be considered as a model of hypoxia induced inflammation. After 6 hours of incubation, IL-6 secretion levels remained similar between D7 and D0 in the controls ( $p=0.78$ ). On the contrary, in the stimulated group, IL-6 level decreased significantly at D7 as compared to D0 ( $p=0.03$ ).

#### **Impact of chronic sacral nerve stimulation upon cytokines mRNA expression in the rectal mucosa (Figure 6)**

Assessment of key inflammatory cytokines mRNA expression in the rectal mucosa showed no difference between groups. TNF mRNA was similar between controls and stimulated group at D7 ( $n=7$ ;  $p=0.62$ )(A). Similarly, IL-6 and IL-8 mRNA expression was identical between these latter groups ( $n=7$ ;  $p=0.53$ ;  $p=0.49$ , respectively)

### **Impact of sacral nerve stimulation upon the neuromuscular transmission in rectal circular muscle strips (Figure 7)**

We next evaluated the impact of SNS upon the neuro-muscular transmission of the circular muscle in the rectum. In the control group, the area under curve (AUC) of the EFS induced contractile response was not different at D7 as compared to D0 ( $p=0.39$ ). In the stimulated group, the AUC of the EFS induced contractile response was significantly increased ( $p=0.03$ ) as compared to D0. In addition, no change in muscle response to addition of carbachol was measured between SNS and control groups at D0 as compared to D7 ( $p=0.29$  and  $p=0.42$  respectively).

During the study, the animals underwent a clinical monitoring of temperature, cardiac frequency and saturation. No modification has been observed during the study period in both groups. For every animal, local infection occurred into the pace maker insertion area but remained clinically not relevant.

Blood cell count increased with serum leucocytes and polynuclear neutrophiles cells into the control group ( $P=0.029$ ;  $p=0.001$ ), whereas no modifications was observed into the stimulated group ( $p=0.06$ ;  $p=0.1$ ).

## Discussion

In the present study we have developed a pig model of chronic SNS (ie pigs were stimulated for 7 days). We first showed that basal paracellular permeability was not changed after chronic SNS as compared to its initial value prior stimulation. However, after chronic SNS, the ability of PAR-2 agonists to increase paracellular permeability was reduced as compared to control animals. In addition, SNS prevented the decrease in ZO-1 mRNA expression observed at the end of the experiments as compared to its initial value. After chronic SNS we also observed, *ex-vivo*, an increased EFS induced contractile response in rectal longitudinal muscle strips. Altogether, our results suggest that, under physiological conditions, chronic SNS does not change significantly rectal functions but might enhance barrier resistance in response to its aggression by stressors such as proteases.

A first important result of the study was the development of a pre-clinical model of chronic SNS in pig. To the best of our knowledge no such animal model of chronic SNS has been reported in the literature. Developing such an approach in the pig represents a major advantage over alternative smaller animal models routinely used in studies. Indeed, gut anatomy and physiology of the pig is similar to that of humans and nervous pathways (structure of ENS and brain organization) involved in SNS are also closer than the ones of smaller animals. In addition, due to the animal size, electrodes and pulse generators used in patients can be directly tested. Consistently we used the human recommended stimulation parameters; in particular, stimulation intensity was set to the minimal value for anal contractions in the pig avoiding nociceptive stimulus(21). During electrode implantation anal contraction was observed; however after chronic SNS anal contraction could not be induced following switching the stimulator to OFF-ON position. Such absence of effect was not due to dysfunction of electrodes as increasing stimulation amplitude was able to induce anal contraction suggesting that adaptative process of muscle contraction. In patients, similar adaptative processes might occur as patients frequently report after few days of stimulation, a decrease in the sensations felt (19,20). Bilateral stimulation was chosen in our study since we have previously shown that bilateral stimulation was more efficient than unilateral in reducing paracellular permeability (13).

A drawback of our study was the presence of local infection of the devices specifically around the stimulators that were placed subcutaneously. Local infection has also been reported in approximately 2 to 11% of patients undergoing permanent implantation (22–24). In our study, this rate was increased putatively due to the fact that we used the same pulse generator for several animals, in particular due to the cost of each stimulator. Indeed, despite thorough sterilization with iodine Polyvidone, the stimulators were probably the source of infection.. Nevertheless, the same conditions occurred in controls (implanted but not stimulated) and stimulated group suggesting that local infection was probably involved in the effects observed.

Altogether, such a model will allow us to better understand mechanism involved in chronic SNS and also identify putative novel therapeutical effects of SNS.

A major surprising finding of our study was that SNS did not modify rectal paracellular permeability after 7 days of chronic stimulation. In addition, no change in epithelium thickness was observed following chronic SRS. This result is in contrast with the ones previously reported after acute (3h) stimulation (13). Indeed, after acute SNS with similar parameters, a significant decrease in paracellular permeability and reduction in epithelium thickness was observed. The cause for these differences remains currently unknown. However we might speculate that they might be due to different regulatory mechanisms induced by short vs long term SNS. In fact, short-term SNS might regulated paracellular permeability via post traductional mechanism such as inducing phosphorylation of MLC or ZO-1. Activation of these pathways can induced rapid and important changes in paracellular permeability. These are activated for instance during acute stress conditions that significantly increase paracellular permeability (15,25,26). In contrast, chronic SNS might regulate other mechanism such as transcriptional regulation of tight junctions associated proteins. Such mechanisms have been shown to occur following electrical field stimulation of the ENS (27). Such mechanisms lead to smaller changes in amplitude of paracellular permeability (27). Interestingly, similar processes occur when acute stressors are applied chronically (28). Consistently with our hypothesis is the observation that SNS modified mRNA expression of key proteins in tight junctions; Indeed, while ZO-1 mRNA decrease over time in non SNS pigs this effect was prevented following

SNS. However, the difference in expression of ZO-1 mRNA between these conditions might not have been large enough to lead to functional changes in permeability, probably in part due to the fact that under basal condition paracellular permeability is already low. However, SNS-induced changes in ZO-1 expression might be involved in the differential tissue response to PAR-2 agonist challenge. Indeed, while PAR-2 agonists were able to increase paracellular permeability in control animals (prior and after 7 days) no such changes were reported after chronic SNS. Consistently other studies have shown that increasing ZO-1 expression was associated with protection from stressors such as pathogens (10,29,30). The factors responsible for changes in ZO-1 expression remain unknown but could be due to local inflammation induced by the biopsy taken at DO. Indeed, a decrease in ZO-1 expression has been reported to occur during intestinal inflammation, both during low grade inflammations such as reported in IBS (31–33) or general inflammation (11,34)(35). However, no changes in mRNA expressions of cytokines were observed in the mucosa the different group of animal. However, one cannot exclude immunomodulatory effects of ENS as using short term organotypic culture we could show that IL-6 secretion was significantly reduced in mucosa segments of SNS animals as compared to controls. However, these SNS-induced modifications in tight junctions expression might be involved in the differences in response of paracellular permeability to stressors such as PAR agonists. Indeed, in controls, we showed that the PAR-2 agonist (SLIGRL) was able to increase paracellular permeability. This result is consistent with previous studies showing that PAR-2 agonists SLIGRL can increase paracellular permeability over short-term period (14,25,36–38). However, SLIGRL tended to increase paracellular permeability at 7 days in controls SLIGRL but not in stimulated animals.

Finally, our *ex vivo* results showed that chronic SNS enhanced EFS induced contractile response of rectal circular muscle. Interestingly, similar effects were observed previously in a canine model where increased neuromuscular transmission induced by SNS was shown to enhance contractile movements of the rectum (39). The precise mechanisms and neuromediators involved in these effects remains to be determined but may involve neuroplastic changes induced by neuronal activity as previously described in the enteric nervous system (40).

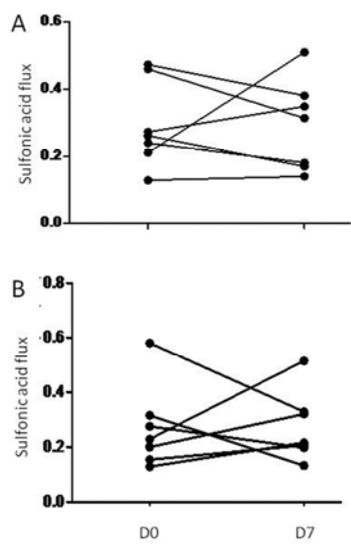
In conclusion, our study has shown the feasibility of chronic SNS in a preclinical relevant animal model. Our study suggests that, under physiological condition, chronic SRS does not significantly modify basal paracellular permeability but exerts barrier protective effect in response to stressors. Our results sets the experimental and scientific basis for further testing the barrier protective effects in animals models disease with barrier dysfunctions such IBD or IBS.

## References

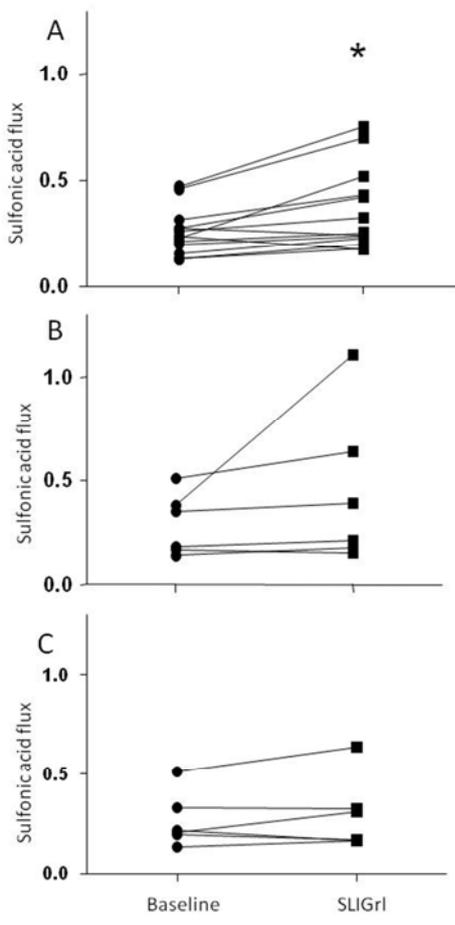
1. Jarrett MED, Mowatt G, Glazener CMA, Fraser C, Nicholls RJ, Grant AM, et al. Systematic review of sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation. *Br J Surg.* déc 2004;91(12):1559-1569.
2. Thomas GP, Dudding TC, Rahbour G, Nicholls RJ, Vaizey CJ. Sacral nerve stimulation for constipation. *Br J Surg.* janv 2013;100(2):174-181.
3. Falletto E, Masin A, Lolli P, Villani R, Ganio E, Ripetti V, et al. Is sacral nerve stimulation an effective treatment for chronic idiopathic anal pain? *Dis. Colon Rectum.* mars 2009;52(3):456-462.
4. Lundby L, Krogh K, Buntzen S, Laurberg S. Temporary sacral nerve stimulation for treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dis. Colon Rectum.* juill 2008;51(7):1074-1078.
5. Vitton V, Gigout J, Grimaud J-C, Bouvier M, Desjeux A, Orsoni P. Sacral nerve stimulation can improve continence in patients with Crohn's disease with internal and external anal sphincter disruption. *Dis. Colon Rectum.* juin 2008;51(6):924-927.
6. Liu Z, Shi C, Yang J, Zhang P, Ma Y, Wang F, et al. Molecular regulation of the intestinal epithelial barrier: implication in human diseases. *Front. Biosci.* 2011;16:2903-2909.
7. Keita AV, Söderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol. Motil.* juill 2010;22(7):718-733.
8. Shen L, Su L, Turner JR. Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis.* 2009;27(4):443-449.
9. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* nov 2009;9(11):799-809.
10. Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, Bourreille A, Neunlist MR, Mahé MM, et al. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut.* avr 2011;60(4):473-484.
11. Costantini TW, Bansal V, Krzyzaniak M, Putnam JG, Peterson CY, Loomis WH, et al. Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* déc 2010;299(6):G1308-1318.
12. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, Bruley des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 20 nov 2012;
13. Meurette G, Blanchard C, Duchalais-Dassonneville E, Coquenlorge S, Aubert P, Wong M, et al. Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* mars 2012;24(3):267-273, e110.
14. Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, et al. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J. Physiol. (Lond.).* 1 août 2004;558(Pt 3):913-925.

15. Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am. J. Pathol.* oct 2005;167(4):1071-1079.
16. Wong MTC, Meurette G, Rodat F, Regenet N, Wyart V, Lehur P-A. Outcome and management of patients in whom sacral nerve stimulation for fecal incontinence failed. *Dis. Colon Rectum.* avr 2011;54(4):425-432.
17. George AT, Kalmar K, Panarese A, Dudding TC, Nicholls RJ, Vaizey CJ. Long-term outcomes of sacral nerve stimulation for fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum.* mars 2012;55(3):302-306.
18. Maeda Y, Laurberg S. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann. Surg.* juill 2011;254(1):174-175; author reply 175-176.
19. Pidsudko Z, Kaleczyc J, Majewski M, Lakomy M, Scheuermann DW, Timmermans JP. Differences in the distribution and chemical coding between neurons in the inferior mesenteric ganglion supplying the colon and rectum in the pig. *Cell Tissue Res.* févr 2001;303(2):147-158.
20. Zalecki M, Podlasz P, Pidsudko Z, Wojtkiewicz J, Kaleczyc J. Vagal projections to the pylorus in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Auton Neurosci.* 2 nov 2012;171(1-2):21-27.
21. Leroi AM, Damon H, Faucheron JL, Lehur PA, Siproudhis L, Slim K, et al. Sacral nerve stimulation in faecal incontinence: position statement based on a collective experience. *Colorectal Dis.* juill 2009;11(6):572-583.
22. Dudding TC, Parés D, Vaizey CJ, Kamm MA. Predictive factors for successful sacral nerve stimulation in the treatment of faecal incontinence: a 10-year cohort analysis. *Colorectal Dis.* mars 2008;10(3):249-256.
23. Marcelissen TAT, Leong RK, Serroyen J, Van Kerrebroeck PEV, De Wachter SGG. The use of bilateral sacral nerve stimulation in patients with loss of unilateral treatment efficacy. *J. Urol.* mars 2011;185(3):976-980.
24. Kaufmann S, Naumann CM, Hamann MF, Seif C, Braun PM, Jünemann KP, et al. Unilateral vs bilateral sacral neuromodulation in pigs with formalin-induced detrusor hyperactivity. *BJU Int.* janv 2009;103(2):260-263.
25. Coelho A-M, Vergnolle N, Guiard B, Fioramonti J, Bueno L. Proteinases and proteinase-activated receptor 2: a possible role to promote visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology.* avr 2002;122(4):1035-1047.
26. Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, Larauche M, Vergnolle N, Bunnett NW, et al. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J. Immunol.* 15 avr 2003;170(8):4296-4300.
27. Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, et al. 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.* nov 2003;285(5):G1028-1036.
28. Söderholm JD, Yang P-C, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, et al. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology.* oct 2002;123(4):1099-1108.

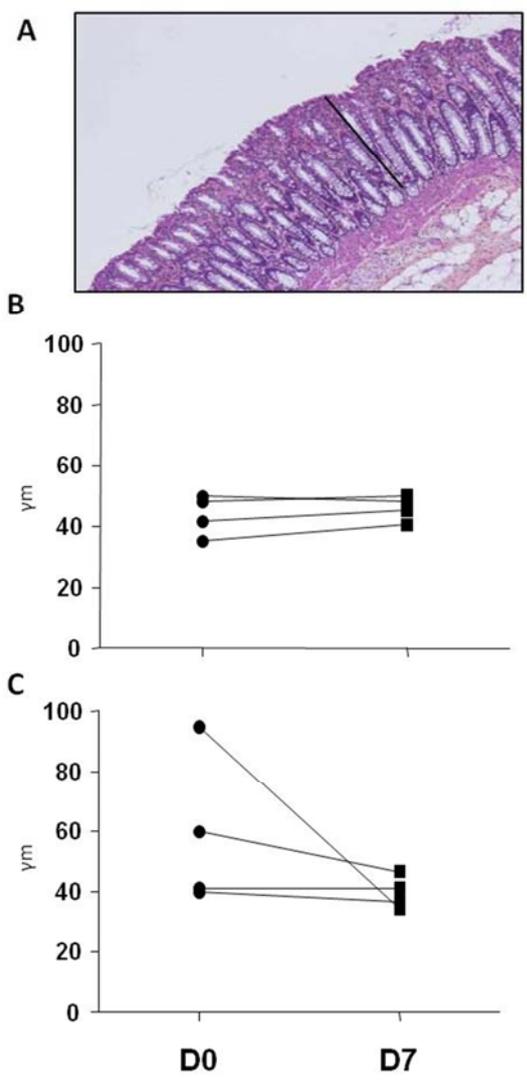
29. Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*. avr 2007;132(4):1344-1358.
30. Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AMJ, et al. Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* oct 2009;297(4):G735-750.
31. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* oct 2012;303(7):G775-785.
32. Bertiaux-Vandaële N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* déc 2011;106(12):2165-2173.
33. Coëffier M, Gloro R, Boukhettala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, et al. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* mai 2010;105(5):1181-1188.
34. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* 1 juin 2007;140(1):12-19.
35. Watson AJM, Hughes KR. TNF- $\alpha$ -induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* juill 2012;1258:1-8.
36. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J. Biol. Chem.* 17 mars 1995;270(11):5950-5955.
37. Cenac N, Coelho A-M, Nguyen C, Compton S, Andrade-Gordon P, MacNaughton WK, et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am. J. Pathol.* nov 2002;161(5):1903-1915.
38. Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, Velazquez-Rocha S, Dery O, Grady EF, et al. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J. Physiol. (Lond.)*. 1 mars 2003;547(Pt 2):531-542.
39. Matsufuji H, Yokoyama J. Neural control of the internal anal sphincter motility. *J Smooth Muscle Res.* avr 2003;39(1-2):11-20.
40. Hirabayashi T, Matsufuji H, Yokoyama J, Hagane K, Hoshino K, Morikawa Y, et al. Colorectal motility induction by sacral nerve electrostimulation in a canine model: implications for colonic pacing. *Dis. Colon Rectum.* juin 2003;46(6):809-817.



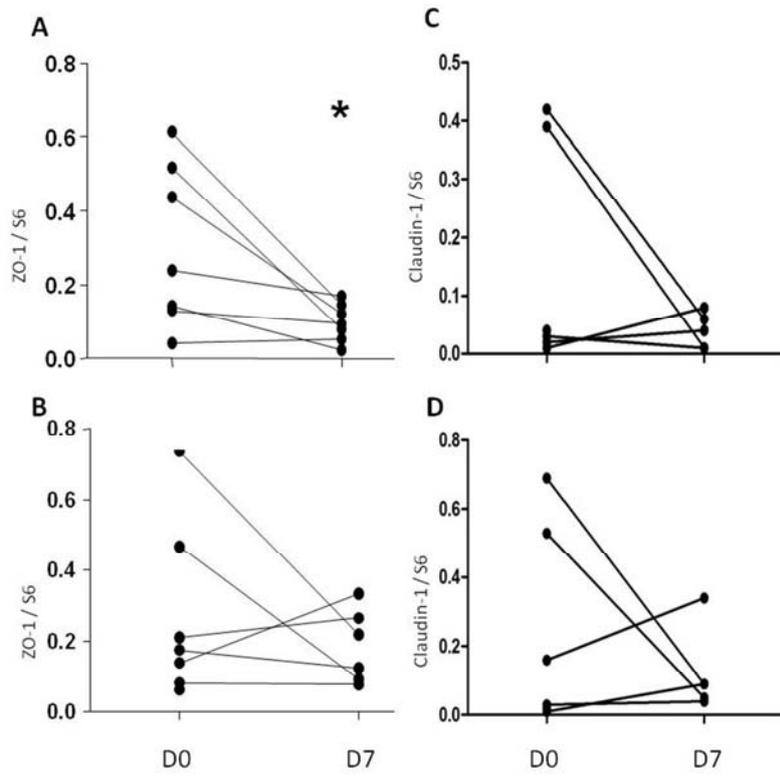
**Figure 1**



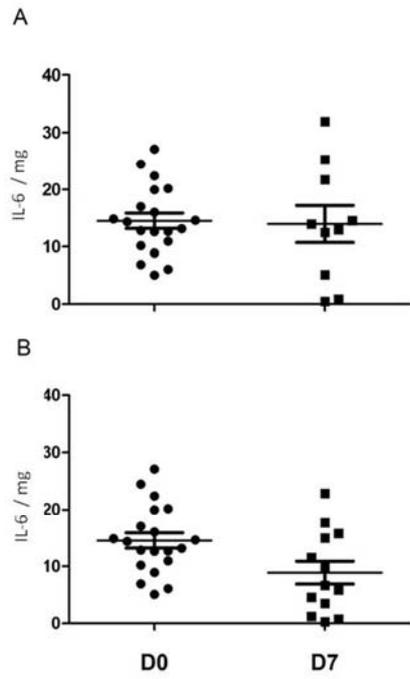
**Figure 2**



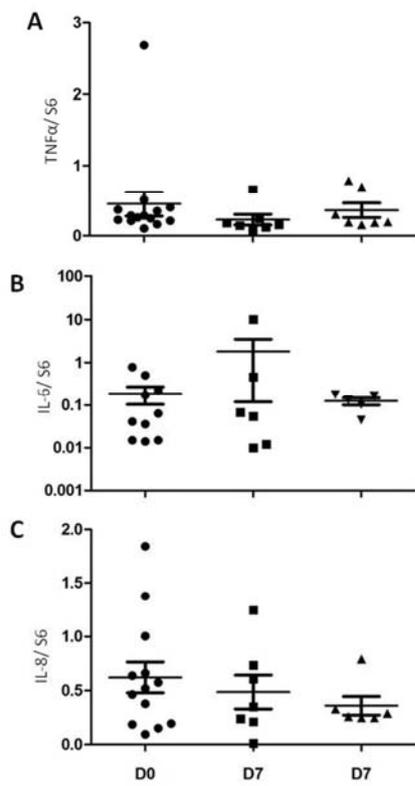
**Figure 3**



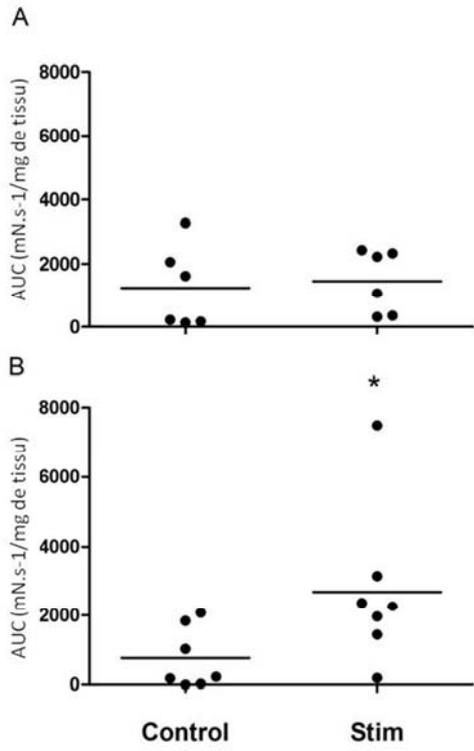
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

## Figure Legends

**Figure 1:** Impact of chronic sacral nerve stimulation on paracellular permeability. As compared to baseline, permeability was not modified after 7 days in both control (A) (n=7) and stimulated group (B) (n=7).

**Figure 2:** Impact of chronic sacral nerve stimulation upon paracellular permeability response to SLIGRL. At the beginning of the experiment (D0), rectal biopsies showed significant increase in paracellular permeability after SLIGRL addition (n=14; P=0.03) (A). After 7 days, control group showed a trend in increasing of permeability (n=7; p=0.06)(B). Bilateral stimulated group showed no modification of permeability (n=7; P=0.25) (C).

**Figure 3:** Impact of chronic sacral nerve stimulation on mucosal histology. Measurement of mucosal thickness on sections stained with hematoxylin eosin and observed under microscope (x40) (A). Evolution of the mucosal thickness for each animal in the control group (B) and in the stimulated group (C). No significant differences was noted in both groups.

**Figure 4:** Impact of chronic sacral nerve stimulation upon tight junction protein mRNA expression in the rectal mucosa. ZO-1 mRNA expression decreased significantly at D7 in controls as compared to D0 (n=7;p=0.03)(A). In the stimulated group, no significant decrease in ZO-1 mRNA expression was observed at D7 as compared to D0 (n=7; p=0.25) (B) . Claudin-1 mRNA expression didn't differ between D0 and D7 in controls (n=7; p=0.5) (C) nor in stimulated group (n=7; p=0.8) (D).

**Figure 5:** Impact of chronic sacral nerve stimulation upon IL-6 secretion by mucosal fragments maintained in organotypic culture. After 6 hours of incubation, IL-6 secretion level remained similar between D7 and D0 in the controls (n=7;p=0.78) (A). On the contrary, into the stimulated group, IL-6 level decreased significantly at D7 as compared to D0 (n=7;p=0.03) (B).

**Figure 6:** Impact of chronic sacral nerve stimulation upon cytokines mRNA expression in the rectal mucosa.

**Figure 7:** Impact of sacral nerve stimulation upon the neuromuscular transmission in rectal circular muscle strips. In the control group, the area under curve (AUC) after EFS was not different at D7 as compared to D0 (p=0.39) (A). Into the stimulated group, AUC after EFS was significantly increased (p=0.03) (B).

5. Efficacité de la SRS dans le traitement de la rectocolite hémorragique résistante au traitement médical. Expérience d'un cas clinique

**Article n°4 (en soumission)**

Nous avons voulu dans une dernière partie, évaluer si les effets mis en évidence sur le modèle animal se traduisaient par une réalité sur la BEI et aussi l'inflammation intestinale chez l'homme. Nous avons ainsi proposé à une patiente qui présentait des troubles de la continence anale dans le contexte d'une rectite inflammatoire réfractaire au traitement médical un test de SRS.

Cette patiente était suivie pour une rectocolite hémorragique de forme basse depuis 10 ans. L'atteinte a toujours été distale, et s'accompagnait de trouble de la continence anale associée. Il n'y avait pas dans ce cas d'autres causes à l'incontinence que la rectite. En effet, le sphincter était normal à l'examen clinique, ainsi qu'en échographie endo-anale. De surcroît, lors des poussées de la maladie, la patiente décrivait une accentuation des épisodes de fuites. Avant d'être incluse dans cette étude, elle recevait un traitement médical par immunosuppresseurs, associant Méthotrexate et Anti-TNF $\alpha$  en traitement de fond. Dans le contexte d'un résultat insuffisant, le traitement chirurgical a été évoqué (coloproctectomie totale), mais ce dernier semblait démesuré compte-tenu du caractère distal des lésions.

L'alternative d'une SRS semblait intéressante dans cette situation particulière associant incontinence anale invalidante pour laquelle la SRS est efficace, et rectite modérée réfractaire au traitement immunosuppresseur.

Pour mesurer les effets de la SRS sur la RCH nous avons eu recours au score Clinique (Lichtiger), score endoscopique (Mayo), score histologique (Geboes); expression des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse (TNF $\alpha$ , IL6, IL8, IFN $\gamma$ ). Pour mesurer les effets de la SRS sur la BEI, nous avons mesuré la perméabilité para-cellulaire, l'expression des protéines de jonctions (ZO-1, Claudines). Pour évaluer les effets de la SRS sur la continence, nous avons retenu le calendrier des selles et le score d'incontinence de Cleveland Clinic Florida.

Cette étude a montré une amélioration de la patiente à la fois en termes de continence, mais aussi d'activité de sa maladie. Ces effets bénéfiques se sont maintenus dans le temps avec un suivi de 18 mois.

**Article 4 (soumission)**

**Improvement of refractory proctitis with Sacral nerve stimulation**

**Guillaume Meurette**<sup>1</sup>, Céline Bossard<sup>2</sup>, Mandy Biraud<sup>1</sup>, Paul-Antoine Lehur<sup>1</sup>, Arnaud Bourreille<sup>1</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 913, institut des maladies de l'appareil digestif, CHU Nantes

## **Improvement of refractory proctitis with Sacral nerve stimulation**

Guillaume Meurette<sup>1</sup>, Céline Bossard<sup>2</sup>, Mandy Biraud<sup>1</sup>, Paul-Antoine Lehur<sup>1</sup>, Arnaud Bourreille<sup>1</sup>, Michel Neunlist<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 913, Institut des maladies de l'appareil digestif, CHU Nantes

<sup>2</sup> Laboratoire d'anatomie Pathologique, CHU Nantes

Corresponding author : Guillaume Meurette [guillaume.meurette@chu-nantes.fr](mailto:guillaume.meurette@chu-nantes.fr)

**Structured Abstract :**

Sacral nerve stimulation (SNS) has been successfully tested in a patient with proctitis. Despite immunosuppressive drugs, the patient suffered from mucus, blood discharge, pain and incontinence. SNS was tested without modification of medications. Geboes, Endoscopic, histological score, ex-vivo barrier permeability, Expression of inflammatory cytokines (TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) and junction proteins (ZO-1, Claudin) were assessed before and after SNS. After a 3-week period of temporary stimulation, the patient experienced significant improvement with a decrease in faecal incontinence and disease activity scores. Both endoscopic and histological scores showed improvement. The rectal barrier permeability and junction proteins mRNA expression decreased with SNS. Clinical and histological improvement sustained the test of time. After 18 months of permanent stimulation, the patient remains improved by SNS.

**Key words :** Ulcerative proctitis /Sacral nerve stimulation

## Case

A 58-yo female patient suffered from proctitis for 12 years. Disease activity was moderate (Geboes score 5.2) but the patient complained of disabling pain, blood and mucus discharge, and faecal incontinence. No dysplasia was found on biopsies. Lesions were limited to the lower rectum. Intensive immunosuppressive medications, with Methotrexate (15 mg/week) and regular Infliximab injections (5mg/Kg) since 12 months didn't alleviate symptoms. Given the limited bowel involvement, proctocolectomy was considered inappropriate. Endoanal ultrasonography showed no sphincter lesions. The patient underwent PNE test for a 3-week period assessed on stool diary and CCF incontinence score and effects of SNS on the ulcerative proctitis were based on clinical (Lichtiger), endoscopic (Mayo Clinic) and histological (Geboes). As considered successful with a significant improvement in disease activity scores and reduction of leaks, the implantation of a permanent *InterstimIII neuromodulator*<sup>TM</sup> (Medtronic) was performed. Moreover *ex-vivo* rectal barrier permeability (*Ussing chamber*), rt-PCR for junctional complex proteins (ZO-1, Claudin.), inflammatory cytokines (IL6, IL8, TGFβ, TNFα) and GFAP were measured on rectal biopsies.

Regarding the inflammatory bowel disease, we observed a significant improvement in both clinical and endoscopic scores occurred (fig1,2). (Disease activity score (Lichtiger) decreased by 50%). Rectal barrier permeability decreased immediately after stimulation (3 hours), then increased (30%) after 1 month of the permanent stimulation, to decrease til the end of follow-up (by 70%). Regarding the rectal biopsies, ZO-1 protein mRNA expression decreased by 50%. Inflammatory cytokines mRNA expression were not modified. Clinical and histological improvement sustained the test of time. No adverse effect were reported during the follow-up.

## **Discussion**

This case-report demonstrates a significant improvement in faecal continence but also in disease severity index score after sacral nerve stimulation in a patient who had received unsuccessful medical treatment for distal proctitis. Faecal incontinence in ulcerative colitis with proctitis is a common complaint, with inflammation into the rectum responsible for tenesmus and a reduction in rectal compliance (1). Despite sphincter abnormalities and fatigability have been reported in IBD patients (2) the main mechanism for faecal incontinence in our patient was the proctitis itself. Despite optimized treatment associating both Infliximab and Methotrexate, the symptoms remained uncompletely improved, in particular for faecal continence. SNS, a minimally invasive approach, was successful in improving faecal continence potentially by modulating the inflammation index inside the lower rectum as demonstrated on the various parameters.

SNS is a validated treatment option in patients affected with severe faecal incontinence. Several studies have shown significant improvement in faecal incontinence score and quality of life (3,4). But exact mechanisms of action of SNS are still matter of debate (5). At present, inflammatory bowel diseases are not considered as an indication for SNS, then few studies reported results in IBD patients. Vitton et al. reported in 2010 improvement of patients treated for incontinence with IBD either with SNS or posterior tibial nerve stimulation (6). We then hypothesized that distal ulcerative colitis could be candidate for SNS. Indeed, significant improvement in both faecal incontinence symptoms and disease activity confirms that SNS could be active on inflammatory patterns of the disease.

Among the putative explanation for our success in treating the patient with SNS, modifications in rectal barrier function can be suggested. Indeed, a reinforcement of the intestinal epithelial barrier of the rectum has been shown in a preclinical model of acute SNS (7). Interestingly, several authors showed alterations in intestinal barrier permeability in

patients with ulcerative colitis (8). Then improvement of intestinal barrier may participate to the benefits of SNS upon UC activity.

Moreover, parasympathetic presacral pathways represent a putative target of SNS. Via anti-inflammatory cholinergic pathway vagal nerve stimulation has been shown to modulate intestinal inflammation (9). Similarly, we suggest that chronic stimulation of presacral parasympathetic pathways provide an anti inflammatory effect upon the rectal mucosa as shown by the decrease of disease severity score (10) on biopsies in our case. Inflammatory cytokines expression also decreased significantly following chronic SNS.

## Références

1. Torres J, Billioud V, Sachar DB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence. *Inflamm. Bowel Dis.* juill 2012;18(7):1356-1363.
2. Papathanasopoulos AA, Katsanos KH, Tatsioni A, Christodoulou DK, Tsianos EV. Increased fatigability of external anal sphincter in inflammatory bowel disease: significance in fecal urgency and incontinence. *J Crohns Colitis.* nov 2010;4(5):553-560.
3. Jarrett MED, Mowatt G, Glazener CMA, Fraser C, Nicholls RJ, Grant AM, et al. Systematic review of sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation. *Br J Surg.* déc 2004;91(12):1559-1569.
4. Matzel KE, Kamm MA, Stösser M, Baeten CGMI, Christiansen J, Madoff R, et al. Sacral spinal nerve stimulation for faecal incontinence: multicentre study. *Lancet.* 17 avr 2004;363(9417):1270-1276.
5. Maeda Y, Laurberg S. Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann. Surg.* juill 2011;254(1):174-175; author reply 175-176.
6. Vitton V, Gigout J, Grimaud J-C, Bouvier M, Desjeux A, Orsoni P. Sacral nerve stimulation can improve continence in patients with Crohn's disease with internal and external anal sphincter disruption. *Dis. Colon Rectum.* juin 2008;51(6):924-927.
7. Meurette G, Blanchard C, Duchalais-Dassonneville E, Coquenlorge S, Aubert P, Wong M, et al. Sacral nerve stimulation enhances epithelial barrier of the rectum: results from a porcine model. *Neurogastroenterol. Motil.* mars 2012;24(3):267-273, e110.
8. Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* janv 2011;17(1):362-381.
9. Bonaz B. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* oct 2007;133(4):1370-1373.
10. Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut.* sept 2000;47(3):404-409.

	Baseline	Pre-test	T 3h	M1	M3	M18
Lichtiger score (/21)	11	11	/	4	5	4
Wexner score (/20)	11	11	/	4	5	5
Endoscopy (Mayo score)	2	2	2	1	1	1
Histology (Geboes)	1.1	5.4	2B.1	1.1	2B.1	2B.1
Medications	MTX IFX	MTX IFX	/	MTX IFX	MTX IFX	MTX IFX

Table 1

Assessment of clinical, endoscopic and histological scores of ulcerative colitis and activity and continence during the follow-up period. **IFX** : Infliximab ; **MTX** : Methotrexate

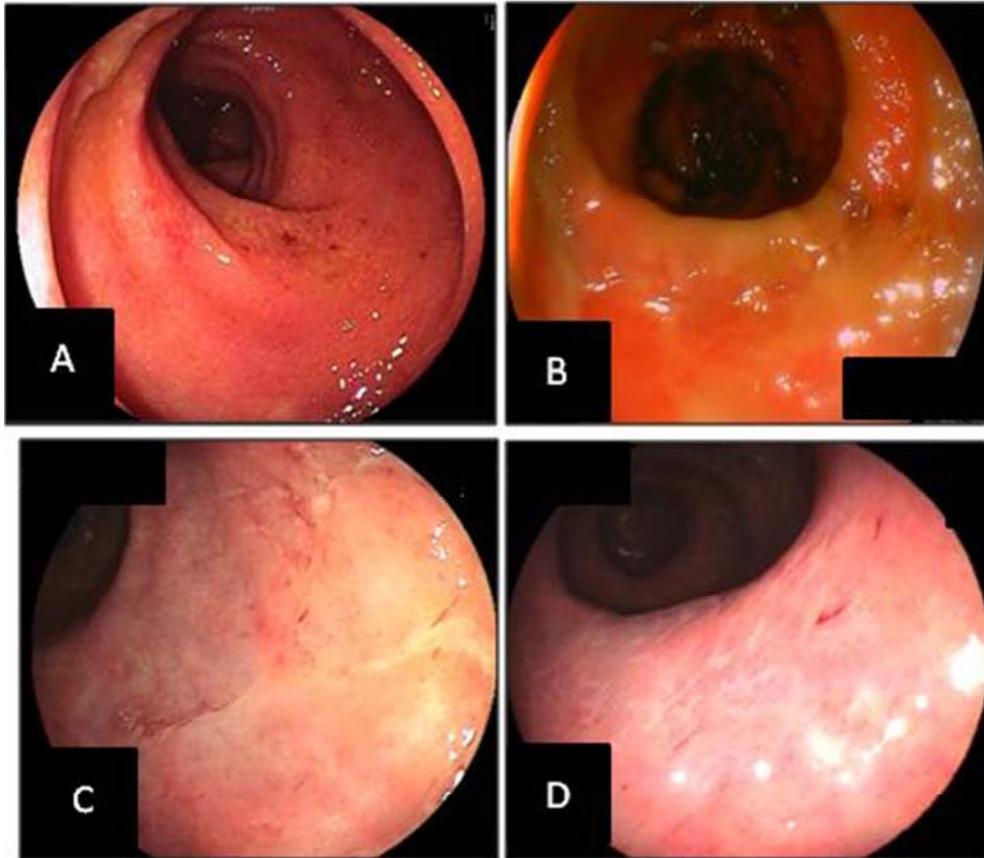


Figure 1

Endoscopic pictures performed during the follow-up. At baseline (A), Immediately before stimulation (B), after 1 and 18 months (C,D) showing improvement of the rectal inflammation

**Quatrième Partie :**

**Discussion générale**

Appliquée au traitement de l'incontinence anale, la SRS a montré son efficacité en diminuant les fuites et augmentant la qualité de vie des patients moyennant une morbidité très faible (Jarrett et al., 2004; Leroi et al., 2009). Cette approche peut raisonnablement être proposée aux patients souffrant d'un trouble de continence réfractaire aux traitements freinateurs du transit. Si son bénéfice est bien démontré par une littérature abondante (Matzel et al., 2004), son mode d'action reste encore très partiellement connu. Les études ont cherché à caractériser l'effet moteur de la SRS non seulement sur le rectum et l'anus mais aussi sur le côlon, (Gourcerol et al., 2011). Il semble ainsi que la SRS exerce un rôle à plusieurs niveaux ; accélérant la motricité colique d'une part, améliorant la compliance du rectum par ailleurs, facilitant la vidange rectale ainsi que la coordination ano-rectale d'autre part. Enfin, un effet direct sur l'appareil sphinctérien a également été décrit (Abdel-Halim et al., 2011). En revanche, l'impact de la SRS sur la barrière épithéliale digestive, qui pourrait participer à l'amélioration de certains symptômes, n'a pas été évalué. Pourtant, dans d'autres modèles de stimulation nerveuse digestive comme la stimulation vagale (Bonaz, 2007), un effet sur les propriétés de la BEI a pu être mis en évidence (Borovikova et al., 2000). Outre une amélioration de nos connaissances sur les mécanismes d'action de la SRS, la perspective de développer de nouvelles indications pour la SRS dans les maladies colorectales avec lésions de la BEI nous semble particulièrement intéressante.

Le recours à un modèle préclinique animal était indispensable pour valider les hypothèses physiologiques et caractériser les effets de la SRS. Nous avons opté pour un modèle porcin qui nous a semblé avoir plusieurs avantages. Au delà de sa rotation donnant un aspect spiralé au côlon, l'anatomie de la partie distale du côlon du rectum et de l'anus se rapproche de celle de l'homme ; de même que l'innervation extrinsèque sur son versant sympathique (Lakomy et al., 1993, 1994; Pidsudko et al., 2001; Wojtkiewicz et al., 2012) et parasympathique (Zalecki et al., 2012) est comparable à celle de l'homme. Enfin, la complexité du cerveau est plus proche de celle de l'homme que d'autres espèces animales couramment étudiées (rat, souris). Par ailleurs, l'anatomie du canal anal, et en particulier de la muqueuse rectale et de la zone transitionnelle anale a montré que l'organisation histologique de l'anus était proche de celle de l'homme (Rettig and Halata, 1990). Ainsi, le porc

représente probablement l'animal le plus proche de l'homme pour mettre en évidence un parallélisme entre les mécanismes d'action et les cibles de la SRS et les outils eux-mêmes (stimulateurs ; paramètres de stimulation). Cette similitude est illustrée par le fait que le porc a servi de modèle expérimental au développement de techniques de transplantation ano-rectale avec succès (O'Bichere et al., 2000) en termes de faisabilité et de viabilité à court terme. Il a aussi servi de modèle de mise au point de technique de transplantation intestinale totale (Pirenne et al., 1996). De façon plus récente, il a pu être montré que le porc représentait un modèle reproductible et proche de l'homme pour l'étude des ischémies coliques et déhiscences après anastomose coliques ou rectales (Hoeppner et al., 2009). Enfin, concernant l'innervation du pelvis, le porc est également utilisé dans plusieurs études explorant les effets de la neurostimulation externe, pour moduler le fonctionnement vésical, ou rectal (Andersen et al., 2005; Møller et al., 2008). Dans ces études antérieures à nos travaux, la neurostimulation était réalisée au niveau sacré, après laminectomie chirurgicale et exposition des racines sacrées ventrales droite et gauche. Les modèles d'animaux utilisés étaient des *minipig Gottingen*, dont le poids était compris entre 19.5 et 28 kg. Dans notre étude des porcs plus grands (40-50kg) étaient utilisés nous permettant ainsi de reproduire à l'identique le protocole de neurostimulation des racines sacrées appliquée chez l'homme en particulier par une approche percutanée. La présentation du matériel dédié pour une stimulation chronique et le volume des générateurs ainsi que le calibre des électrodes nous obligeaient à recourir au grand animal. Ce choix nous a ainsi permis de valider un modèle reproductible de SRS selon les modalités identiques à l'homme.

Cependant, l'utilisation d'un modèle porcin nous a exposé à plusieurs inconvénients. D'une part, le nombre d'animaux inclus dans l'étude a été inférieur en comparaison d'un plus petit modèle (rat, guinea-pig) en raison des conditions de réalisation, d'hébergement et de contraintes de surveillance. Aussi l'ensemble de nos résultats doivent être interprétés avec les limitations statistiques associées aux groupes de faibles échantillons. Ils doivent aussi être validés sur des échantillons plus larges. De plus, le coût des dispositifs de neurostimulations (10keuros/échantillon) nous a fait opter pour une stérilisation et réutilisation des dispositifs dédiés à un usage unique chez l'homme, responsable d'infection de la poche du stimulateur et ce malgré les conditions d'asepsies

peropérateurs. Enfin, le recours à des animaux naïfs de grands modèles provenant de plusieurs portées distinctes nous a exposés à un risque de plus grande variabilité génétique et donc de réponse au traitement que si ces expériences avaient été réalisées sur modèle murin ou rat. Néanmoins, cet inconvénient à l'avantage de se rapprocher de la condition chez l'homme. Enfin, les conditions d'expérimentations ont pu être source de variabilité de nos résultats, particulièrement en situation de stimulation chronique. En effet, bien que les animaux aient été hébergés en box individuels, nourris et entretenus de façon similaire, certaines blessures corporelles survenues en cours d'expérimentation (plaies membres inférieurs) pouvaient interférer avec les résultats obtenus (notamment en termes d'inflammation).

Parmi les paramètres principaux régulés par la SRS que nous avons voulu étudier la BEI (modifications morphologiques et fonctionnelles), mais également la transmission neuromusculaire, et les relais neuronaux intermédiaires entre SRS et les effecteurs fonctionnels (BEI ou muscle), en particulier le système nerveux entérique (plexus sous-muqueux et myentérique). Dans ce contexte, il nous a paru nécessaire de disposer d'outils pour standardiser une évaluation globale de l'unité neuro-glio-épithéliale et musculaire dans le suivi d'une SRS chronique. Le développement de biopsies pan-pariétales par voie endoscopique nous a semblé une option d'avenir pour analyser les effets de la SRS sur le côlon (au-delà du rectum). Pour notre modèle animal, les biopsies chirurgicales étaient possibles par voie transanale au niveau du rectum (nous avons utilisé cette technique dans nos travaux sur le rectum), mais l'exploration du côlon d'amont nécessitait une laparotomie, ce qui compromettait le réveil des animaux et l'étude longitudinale des effets chroniques de la SRS. Notre étude préliminaire a donc permis de valider cette approche endoscopique sans toutefois assurer une fermeture étanche des biopsies de façon suffisamment reproductible (50% d'étanchéité sur la fermeture des biopsies) pour les inclure d'emblée dans le protocole de stimulation chronique. Cet échec de fermeture était principalement lié à la fiabilité des dispositifs encore en cours d'élaboration et d'évaluation (Pohl et al., 2010). De plus, cette étude a aussi montré qu'à partir de 1 biopsie et en utilisant des approches d'exploration fonctionnelle et morphologique ex vivo développé au laboratoire nous sommes en mesure de réaliser une véritable analyse fonctionnelle et morphologique extemporanée. Par ailleurs,

dans l'hypothèse d'une application chez l'homme, l'approche endoscopique nous semble intéressante à développer à la fois dans l'exploration du rectum comme du colon pour limiter le caractère invasif des biopsies chirurgicales profondes qui requièrent une anesthésie générale. Cette approche pourrait contribuer à l'avenir à améliorer le diagnostic de pathologies motrices sévères (pseudo-obstruction intestinale chronique ; IBS sévères) et aussi guider le choix thérapeutique.

Un des principaux résultats de nos travaux a été la mise en évidence d'un effet de la SRS sur la barrière épithéliale rectale. Ces effets comprennent une diminution de la perméabilité para-cellulaire associée à une augmentation de la sécrétion de mucus après 3h de SRS, puis, après 7j de SRS continue, une perméabilité qui n'était plus modifiée par rapport à sa valeur initiale avant SRS. Néanmoins à ce stade, la SRS tendait à protéger la BEI en prévenant les lésions induite par un ligand de PAR-2 sur la BEI. Parallèlement nous avons observé que la perte d'expression de l'ARNm de ZO-1 (au cours du temps) constatée chez les porcs non stimulés était prévenue par la SRSce qui renforce l'hypothèse d'un impact de la SRS chronique sur la BEI. Cet effet d'adaptation de la muqueuse à la SRS a aussi été observé au niveau moteur. En effet, nous avons constaté qu'après 7 jours de stimulation, l'effet moteur de la SRS sur le sphincter anal, n'était plus spontanément visible sous forme d'une contraction. En revanche, si on éteignait puis reprenait la stimulation (suivant les mêmes paramètres), de nouveau, les contractions réapparaissaient suggérant que l'absence d'effet n'était pas due à un défaut de stimulation. De façon similaire, on constate chez les patients traités par SRS, un phénomène de diminution de la perception de la stimulation avec le temps (Leroi et al., 2009; Wong et al., 2011), pour autant non corrélée à une diminution de l'efficacité thérapeutique. Notre étude chronique a également montré l'absence d'effet délétère de la SRS sur la muqueuse, notamment l'absence d'infiltration inflammatoire ou de modification significative de l'expression de l'ARNm des cytokines inflammatoires à l'état basal.

Sur la base de ces différents résultats, la diminution de l'impact fonctionnel de la SRS au cours du temps (ie stimulation aigue vs chronique) peut être liée à des mécanismes de régulation et d'adaptation physiologiques distincts de la perméabilité. En effet, la stimulation aigue peut mettre en jeu des voies de modifications post traductionnelles de protéines régulant la perméabilité sur le court

terme tels que le MLCK et ayant un grand impact fonctionnel (Cunningham and Turner, 2012). Cette voie est en particulier impliquée dans l'augmentation rapide de la perméabilité para-cellulaire par le glucose (visant à favoriser absorption des nutriments). Notre étude suggère que la stimulation chronique de ces voies pourrait conduire à une désensibilisation (perte d'activité) en mettant en jeu d'autres voies de régulation (transcriptionnelles) telles que décrites précédemment (Neunlist et al., 2003a). Cet effet sur l'expression de l'ARNm de ZO-1 n'est probablement pas suffisante pour impacter sur une perméabilité basale déjà réduite (comme c'est le cas dans notre modèle physiologique) mais peut être suffisante pour augmenter la résistance de la BEI à des stimuli induisant une dégradation de ces marqueurs (stimuli inflammatoires ; ligand PAR).

A terme l'effet de modulation des différents paramètres de stimulation (stimulation continu vs intermittente ; fréquences de stimulation) sur la BEI devra être étudié. En effet, en faisant varier les fréquences de stimulations, un contrôle plus ciblé des médiateurs libérés par la SRS pourrait être envisagé. En effet, la stimulation de basse fréquence tend à libérer des médiateurs de petite taille (amine ; ACh) qui augmentent la perméabilité para-cellulaire alors qu'à haute fréquence plutôt des médiateurs tels que les peptides (VIP) qui diminuent la perméabilité. D'autre part, la stimulation intermittente (quelques heures) pourrait contribuer à prévenir les processus de désensibilisation et donc de maintenir un effet chronique sur la BEI. De même la SRS bilatérale avait dans notre expérience plus d'effet que la stimulation unilatérale, du moins après une courte période de stimulation. Ces résultats plaident en faveur d'un test bilatéral lorsque la réponse thérapeutique n'est pas optimale, comme semblent le suggérer certains auteurs en pratique clinique.

Enfin, notre étude suggère aussi que la SRS a un effet immuno-modulateur. En effet, nos travaux ont montré que 1) la culture de fragments coliques issus d'animaux stimulés ont une sécrétion réduite de cytokines pro-inflammatoire tels que l'IL-6 et 2) la SRS tend à diminuer les marqueurs inflammatoires systémiques. Ces effets sont en accord et viennent étendre en partie ceux obtenus avec la stimulation vagale. En effet, des études récentes (Bonaz, 2007; Costantini et al., 2010, 2012; Ghia et al., 2006) ont mis en évidence l'existence d'un réflexe anti inflammatoire vagal impliqué dans différences affections inflammatoires (choc septique ; MICI, brûlures). Nos travaux restent encore

préliminaires et doivent être validés sur des échantillons plus larges et surtout en utilisant des modèles expérimentaux appropriés notamment de colites.

Une des limitations de nos travaux a été le manque d'identification de mécanismes responsables des effets de la SRS sur la BEI. Ces mécanismes sont probablement complexes associant à la fois des circuits périphériques et centraux. L'utilisation d'outils d'imagerie fonctionnelle cérébrale développée chez le porc associé à des études immuno-histochimiques d'activation du SNE ou réseau ganglionnaires périphériques (plexus) permettra de mieux aborder ces questions dans le futur. En effet, chez l'homme, plusieurs études ont montré qu'il existait au cours de la SRS, des modifications fonctionnelles cérébrales, à la fois au niveau sous cortical, mais également au niveau cortical (Gourcerol et al., 2011). On peut par ailleurs évoquer également la stimulation des fibres du plexus parasympathique présacré. Enfin, il semble intéressant de caractériser à l'avenir les voies de transmission de la SRS au sein de la paroi colique et rectale, en particulier le système nerveux entérique. Dans ce domaine, nos résultats préliminaires ont identifié une modification de la transmission neuromusculaire au cours de la SRS, liée à une hyperexcitabilité d'origine neuronale. De plus, des travaux non publiés ont montré une augmentation de la proportion de neurones myentériques exprimant c-Fos chez les animaux SRS par rapport aux animaux contrôles. Outre l'activation de voies neuronales spécifiques, la SRS, en particulier chronique, peut aussi induire une plasticité des réseaux neuronaux mis en jeu, en particulier caractérisée par une modification de la nature et/ou expression de neuromédiateurs. En effet, différentes études ont montré que l'activation chronique du SNE (plusieurs jours) induit une augmentation de médiateurs clés impliqués dans la BEI (VIP ; TH) (Chevalier et al., 2008) ainsi que des molécules participant aux processus d'exocytose ( $\alpha$ -synucleine) (Paillusson et al., 2012). Dans le cas de la SRS, une étude (Gooneratne et al., 2008) a montré une augmentation du nombre de neurones immuno-réactifs pour la substance P chez des patients incontinents par rapport à une population contrôle à partir d'examens immuno-histochimiques sur des coupes de rectum. Sous l'effet de la SRS, il existait chez ces patients une diminution de la quantité des mêmes neurones immuno-réactifs pour la substance P après 14 puis 90 jours.

Un autre élément important de notre travail a été la démonstration, dans un cas clinique, des effets anti-inflammatoires potentiels de la SRS au cours de la RCH. Ce résultat illustre d'abord l'utilité et la pertinence d'une recherche translationnelle chez le grand animal. En effet, nous avons développé une approche partant d'une application clinique validée (prise en charge de l'incontinence anale) pour la transférer vers un modèle animal et identifier une nouvelle application potentielle de la SRS (renforcement de la BEI) et avant de la transférer rapidement chez l'homme dans une nouvelle application thérapeutique (troubles digestifs inflammatoires). Dans le contexte d'une maladie inflammatoire dont l'atteinte est principalement distale (rectite ulcéreuse) nous avons évalué l'efficacité de la SRS chez un patient dont le traitement médical ne permettait pas le contrôle de la maladie, et chez qui l'alternative thérapeutique chirurgicale avec une coloproctectomie totale semblait démesurée compte tenu du caractère distal de la maladie (rectite). Le succès thérapeutique obtenu est encourageant, une évaluation dans le cadre d'une étude prospective multicentrique randomisée est en cours d'élaboration. Nos résultats suggèrent également que la SRS pourrait agir dans la prévention des atteintes inflammatoires. Dans ce contexte, il ne s'agit plus seulement du contexte curatif, mais également en prévention des récurrences. En effet, malgré les progrès récents dans le domaine du traitement des maladies inflammatoires et en particulier de la RCH, la prévention des récurrences reste un problème d'actualité et amène les cliniciens à poursuivre des traitements immunosuppresseurs de façon prolongée. La SRS pourrait alors représenter une alternative prometteuse. Ces applications cliniques de la SRS pourraient être étendues à d'autres pathologies dans lesquelles des dysfonctions de la BEI jouent un rôle central soit dans la physiopathologie, soit dans les symptômes tels que l'IBS. Ces résultats doivent naturellement être validés sur un effectif plus grand.

Enfin, d'un point de vue clinique, notre travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives de valorisation pour identifier des bio-marqueurs de réponse ou d'efficacité de la SRS. EN effet, une des difficultés est d'identifier les patients répondeurs vs non répondeurs. En effet, dans 15 à 30 % des cas la SRS ne montre pas d'efficacité ou une perte de celle-ci au cours du suivi. Aussi l'identification de marqueurs de réponse pourrait permettre de sélectionner les patients répondeurs et ainsi diminuer coût sociétal de cette approche. Dans ce contexte, la mise en place d'une étude clinique visant à démontrer

chez les patients neurostimulés que la SRS induit une modification de la perméabilité, et que l'amplitude de celle-ci est un marqueur prédictif d'efficacité de réponse, est un projet à court terme. Cette hypothèse de marqueur d'efficacité est renforcée aussi par nos données chez l'animal montrant que la SRS bilatérale augmente l'amplitude de la réponse.

## **Cinquième Partie :**

### **Conclusion et perspectives**

Cette thèse s'intègre dans un objectif de recherche résolument translationnel associant à la fois mes compétences cliniques et chirurgicales et celle de l'UMR 913 dans laquelle j'ai effectué mon travail de recherche. Notre objectif initial était de mettre en place un modèle préclinique pertinent et reproductible de SRS chez le porc. Ce modèle nous a permis de démontrer que la SRS avait des effets sur la BEI, ce qui n'avait pas encore été montré.

Parmi ces effets, la modification de la perméabilité para-cellulaire a été évaluée. Elle diminue à un stade aigu, puis retrouve un niveau basal tout en conservant un effet protecteur contre les agents stressants à un stade plus chronique. Nous avons souligné la plasticité de la BEI, qui semble initier des mécanismes adaptatifs sous l'effet de la SRS, tout en conservant l'empreinte de la stimulation avec une meilleure résistance au stress.

En outre, ces résultats sont concordants avec le second constat qui concerne l'effet immunomodulateur de la SRS. Bien qu'étant encore préliminaires, ces résultats nous semblent importants. En effet, nous avons montré une diminution de sécrétion d'IL-6 localement dans la muqueuse rectale soumise à un stress par organoculture, et de façon parallèle, la réaction inflammatoire systémique est moindre sous l'effet de la SRS.

Ces résultats obtenus chez le porc pourront permettre de mieux appréhender les mécanismes d'action de la SRS. Plus particulièrement, nos travaux futurs viseront à identifier le rôle du SNE dans les effets de la SRS et aussi de déterminer si ces effets restent localisés au rectum ou bien s'étendent sur une portion plus large du colon. Nous pourrions identifier des facteurs histo-pronostiques de réponse à la SRS dans ses différentes indications notamment l'incontinence anale, la constipation et le syndrome d'intestin irritable. Il n'existe en effet actuellement pas de facteurs prédictifs de réponse au test, ce qui manque pour sélectionner les meilleurs candidats à cette approche thérapeutique. Dans ce contexte, le développement par des outils innovants de prélèvements (comme les biopsies panariétales ou bien la microscopie confocale) permettant d'explorer l'unité neuro-glio-épithéliale sur l'ensemble du côlon paraît intéressante et le modèle animal adapté pour ces études indispensables avant un transfert en routine chez l'homme.

De plus, le développement de modèles de pathologies humaines chez le porc (IBS ; MICI) permettra d'identifier d'autres applications thérapeutiques de la SRS dans des pathologies avec lésions de la BEI, pour lesquelles un renforcement est bénéfique, comme la colite ou rectite. Ces modèles déjà rapportés nous permettront de tester les situations de SRS en traitement curatif et préventif de l'inflammation.

Enfin, notre premier cas clinique conforte nos hypothèses et incite à envisager une étude à plus grande échelle randomisée et prospective, en proposant la SRS en alternative aux traitements chirurgicaux plus agressifs comme la coloproctectomie totale pour les formes distales de RCH, un projet doit être déposé en 2013 dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique.

Ainsi bien que mes travaux de thèse restent principalement descriptifs, ils apportent de nouvelles données sur le mécanisme d'action de la SRS, et fondent le rationnel scientifique d'une nouvelle application thérapeutique potentielle de la SRS dans les pathologies associées à des dysfonctions de la BEI.

## Références bibliographiques

- Abdel-Halim, M.R.E., Crosbie, J., Engledow, A., Windsor, A., Cohen, C.R.G., and Emmanuel, A.V. (2011). Temporary sacral nerve stimulation alters rectal sensory function: a physiological study. *Dis. Colon Rectum* *54*, 1134–1140.
- Abell, T., McCallum, R., Hocking, M., Koch, K., Abrahamsson, H., Leblanc, I., Lindberg, G., Konturek, J., Nowak, T., Quigley, E.M.M., et al. (2003). Gastric electrical stimulation for medically refractory gastroparesis. *Gastroenterology* *125*, 421–428.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2066–2078.
- Aggarwal, A., Cutts, T.F., Abell, T.L., Cardoso, S., Familoni, B., Bremer, J., and Karas, J. (1994). Predominant symptoms in irritable bowel syndrome correlate with specific autonomic nervous system abnormalities. *Gastroenterology* *106*, 945–950.
- Allen, A., Hutton, D.A., and Pearson, J.P. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *30*, 797–801.
- Altomare, D.F., Rinaldi, M., Petrolino, M., Monitillo, V., Sallustio, P., Veglia, A., De Fazio, M., Guglielmi, A., and Memeo, V. (2004). Permanent sacral nerve modulation for fecal incontinence and associated urinary disturbances. *Int J Colorectal Dis* *19*, 203–209.
- Altomare, D.F., Rinaldi, M., Lobascio, P., Marino, F., Giuliani, R.T., and Cuccia, F. (2011). Factors affecting the outcome of temporary sacral nerve stimulation for faecal incontinence. The value of the new tined lead electrode. *Colorectal Dis* *13*, 198–202.
- Andersen, I.S., Rijkhoff, N.J.M., Vukovic, A., Buntzen, S., Djurhuus, J.C., and Laurberg, S. (2005). Anorectal motility responses to selective stimulation of the ventral sacral nerve roots in an experimental model. *Br J Surg* *92*, 1513–1519.
- Andriantsitohaina, R., and Surprenant, A. (1992). Acetylcholine released from guinea-pig submucosal neurones dilates arterioles by releasing nitric oxide from endothelium. *J. Physiol. (Lond.)* *453*, 493–502.
- Apostolova, G., and Dechant, G. (2009). Development of neurotransmitter phenotypes in sympathetic neurons. *Auton Neurosci* *151*, 30–38.
- Arrieta, M.C., Madsen, K., Doyle, J., and Meddings, J. (2009). Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* *58*, 41–48.
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M.M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M.G., Lardeux, B., Neunlist, M., and Masson, D. (2010). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J. Physiol. (Lond.)* *588*, 2533–2544.
- Baeten, C.G.M.I. (2011). Status of sacral neuromodulation for refractory constipation. *Colorectal Dis* *13 Suppl 2*, 19–22.
- Bär, K.J., Facer, P., Williams, N.S., Tam, P.K., and Anand, P. (1997). Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* *112*, 1381–1385.

- Barker, N., Van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* *22*, 1856–1864.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* *53*, 501–506.
- Barreau, F., Salvador-Cartier, C., Houdeau, E., Bueno, L., and Fioramonti, J. (2008). Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* *57*, 582–590.
- Berghmans, T.M.P., Hulsewé, K.W.E., Buurman, W.A., and Luyer, M.D.P. (2012). Stimulation of the autonomic nervous system in colorectal surgery: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* *13*, 93.
- Berthoud, H.-R., Hennig, G., Campbell, M., Volaufova, J., and Costa, M. (2002). Video-based spatio-temporal maps for analysis of gastric motility in vitro: effects of vagal stimulation in guinea-pigs. *Neurogastroenterol.Motil.* *14*, 677–688.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 12497–12502.
- Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., and Turner, J.R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* *86*, 191–201.
- Blaugrund, E., Pham, T.D., Tennyson, V.M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D.J., and Gershon, M.D. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* *122*, 309–320.
- Bonaz, B. (2007). The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* *133*, 1370–1373.
- Bonaz, B., Picq, C., Sinniger, V., Mayol, J.F., and Clarençon, D. (2013a). Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterol.Motil.*
- Bonaz, B., Picq, C., Sinniger, V., Mayol, J.F., and Clarençon, D. (2013b). Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterol.Motil.*
- Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol.Motil.* *16 Suppl 1*, 34–38.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., and Tracey, K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* *405*, 458–462.
- BOYCE, W.H., LATHEM, J.E., and HUNT, L.D. (1964). RESEARCH RELATED TO THE DEVELOPMENT OF AN ARTIFICIAL ELECTRICAL STIMULATOR FOR THE PARALYZED HUMAN BLADDER: A REVIEW. *J. Urol.* *91*, 41–51.
- Von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* *11*, 3.
- Boyer, L., Ghoreishi, M., Templeman, V., Vallance, B.A., Buchan, A.M., Jevon, G., and Jacobson, K. (2005). Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosci* *117*, 41–53.

- Boyle, D.J., Knowles, C.H., Lunniss, P.J., Scott, S.M., Williams, N.S., and Gill, K.A. (2009). Efficacy of sacral nerve stimulation for fecal incontinence in patients with anal sphincter defects. *Dis. Colon Rectum* 52, 1234–1239.
- Bradley, J.S., Jr, Parr, E.J., and Sharkey, K.A. (1997). Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 289, 455–461.
- Brindley, G.S. (1977). An implant to empty the bladder or close the urethra. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 40, 358–369.
- Brindley, G.S. (1993). Physiological considerations in the use of sacral anterior root stimulators. *Neurourol. Urodyn.* 12, 485–486.
- Brookes, S.J., Meedeniya, A.C., Jobling, P., and Costa, M. (1997). Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* 505 ( Pt 2), 473–491.
- Brouwer, R., and Duthie, G. (2010). Sacral nerve neuromodulation is effective treatment for fecal incontinence in the presence of a sphincter defect, pudendal neuropathy, or previous sphincter repair. *Dis. Colon Rectum* 53, 273–278.
- Bullen, T.F., Forrest, S., Campbell, F., Dodson, A.R., Hershman, M.J., Pritchard, D.M., Turner, J.R., Montrose, M.H., and Watson, A.J.M. (2006). Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab. Invest.* 86, 1052–1063.
- Burns, A.J., Pasricha, P.J., and Young, H.M. (2004). Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1, 3–7.
- Burns, A.J., Roberts, R.R., Bornstein, J.C., and Young, H.M. (2009). Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin. Pediatr. Surg.* 18, 196–205.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93, 189–201.
- Calmont, A., Thapar, N., Scambler, P.J., and Burns, A.J. (2011). Absence of the vagus nerve in the stomach of *Tbx1*<sup>-/-</sup> mutant mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, 125–130.
- Cameron, H.L., and Perdue, M.H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 47–56.
- Camilleri, M. (2012). Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N. Engl. J. Med.* 367, 1626–1635.
- Camilleri, M., Lasch, K., and Zhou, W. (2012). Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G775–785.
- Caraballo, R., Bologna, R.A., Lukban, J., and Whitmore, K.E. (2001). Sacral nerve stimulation as a treatment for urge incontinence and associated pelvic floor disorders at a pelvic floor center: a follow-up study. *Urology* 57, 121.

- Castell, T., Gómez de Segura, I.A., Vázquez, I., Mata, A., and 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, 54–59.
- Chan, M.K.Y., and Tjandra, J.J. (2008). Sacral nerve stimulation for fecal incontinence: external anal sphincter defect vs. intact anal sphincter. *Dis. Colon Rectum* 51, 1015–1024; discussion 1024–1025.
- Chaturvedi, L.S., Marsh, H.M., Shang, X., Zheng, Y., and Basson, M.D. (2007). Repetitive deformation activates focal adhesion kinase and ERK mitogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells through Src and Rac1. *J. Biol. Chem.* 282, 14–28.
- Cheetham, M., Brazzelli, M., Norton, C., and Glazener, C.M.A. (2003). Drug treatment for faecal incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD002116.
- Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., and Neunlist, M. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 1963–1975.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Esposito, G., Grosso, M., Petruzzelli, R., Izzo, P., Calì, G., D’Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., et al. (2009). Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. *Neurogastroenterol.Motil.* 21, 1209–e112.
- Conaghan, P., and Farouk, R. (2005). Sacral nerve stimulation can be successful in patients with ultrasound evidence of external anal sphincter disruption. *Dis. Colon Rectum* 48, 1610–1614.
- Connor, D.E., Jr, Nixon, M., Nanda, A., and Guthikonda, B. (2012). Vagal nerve stimulation for the treatment of medically refractory epilepsy: a review of the current literature. *Neurosurg Focus* 32, E12.
- Cook, R.D., and Burnstock, G. (1976). The ultrastructure of Auerbach’s plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J. Neurocytol.* 5, 195–206.
- Costa, M., Brookes, S.J., Steele, P.A., Gibbins, I., Burcher, E., and Kandiah, C.J. (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75, 949–967.
- Costantini, T.W., Bansal, V., Krzyzaniak, M., Putnam, J.G., Peterson, C.Y., Loomis, W.H., Wolf, P., Baird, A., Eliceiri, B.P., and Coimbra, R. (2010). Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1308–1318.
- Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.-M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., and Coimbra, R. (2012). Targeting  $\alpha$ -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am. J. Pathol.* 181, 478–486.
- Cunningham, K.E., and Turner, J.R. (2012). Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 34–42.
- Cury, D.H.B., Costa, J.E., Irika, K., Mijji, L., Garcez, A., Buchiguel, C., Silva, I., and Sipahi, A. (2008). Protective effect of octreotide and infliximab in an experimental model of indomethacin-induced inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 53, 2516–2520.

- Dantzer, R., Konsman, J.P., Bluthé, R.M., and Kelley, K.W. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 85, 60–65.
- Davies, A.M. (2009). Extracellular signals regulating sympathetic neuron survival and target innervation during development. *Auton Neurosci* 151, 39–45.
- Deloose, E., Janssen, P., Depoortere, I., and Tack, J. (2012). The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 271–285.
- Dignass, A.U., Becker, A., Spiegler, S., and Goebell, H. (1998). Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 554–561.
- Dinning, P.G., Fuentealba, S.E., Kennedy, M.L., Lubowski, D.Z., and Cook, I.J. (2007). Sacral nerve stimulation induces pan-colonic propagating pressure waves and increases defecation frequency in patients with slow-transit constipation. *Colorectal Dis* 9, 123–132.
- Dudding, T.C. (2011). Future indications for sacral nerve stimulation. *Colorectal Dis* 13 *Suppl* 2, 23–28.
- Dudding, T.C., Parés, D., Vaizey, C.J., and Kamm, M.A. (2008). Predictive factors for successful sacral nerve stimulation in the treatment of faecal incontinence: a 10-year cohort analysis. *Colorectal Dis* 10, 249–256.
- Dunlop, S.P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A.C., and Spiller, R.C. (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1288–1294.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* 130, 1–20.
- Engel, M.A., and Neurath, M.F. (2010). New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J. Gastroenterol.* 45, 571–583.
- Enomoto, H., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (2000). Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin. *Development* 127, 4877–4889.
- Ericsson, A., Kovács, K.J., and Sawchenko, P.E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J. Neurosci.* 14, 897–913.
- Esposito, G., Cirillo, C., Sarnelli, G., De Filippis, D., D’Armiento, F.P., Rocco, A., Nardone, G., Petruzzelli, R., Grosso, M., Izzo, P., et al. (2007). Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. *Gastroenterology* 133, 918–925.
- Falsetto, E., Masin, A., Lolli, P., Villani, R., Ganio, E., Ripetti, V., Infantino, A., and Stazi, A. (2009). Is sacral nerve stimulation an effective treatment for chronic idiopathic anal pain? *Dis. Colon Rectum* 52, 456–462.
- Faucheron, J.-L., and Herault, M.-C. (2012). Life threatening haemorrhage after electrode removal: a severe complication following sacral nerve stimulation procedure for the treatment of faecal incontinence. *Colorectal Dis* 14, e133.

Faucheron, J.-L., Voirin, D., and Badic, B. (2010). Sacral nerve stimulation for fecal incontinence: causes of surgical revision from a series of 87 consecutive patients operated on in a single institution. *Dis. Colon Rectum* 53, 1501–1507.

Ferri, G.L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P.J., and Polak, J.M. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297, 409–410.

Van der Flier, L.G., Van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegerbarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., Van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., et al. (2009). Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 136, 903–912.

Fornai, F., Ruffoli, R., Giorgi, F.S., and Paparelli, A. (2011). The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 33, 2169–2178.

Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* 130, 55–70.

Frey, A., Giannasca, K.T., Weltzin, R., Giannasca, P.J., Reggio, H., Lencer, W.I., and Neutra, M.R. (1996). Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J. Exp. Med.* 184, 1045–1059.

Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 87–96.

Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 286–294.

Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* 54, 1–18.

Furness, J.B., Kunze, W.A., and 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, G922–928.

Galligan, J.J., Jiang, M.M., Shen, K.Z., and Surprenant, A. (1990). Substance P mediates neurogenic vasodilatation in extrinsically denervated guinea-pig submucosal arterioles. *J. Physiol. (Lond.)* 420, 267–280.

Galvis, G., Lips, K.S., and Kummer, W. (2006). Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages. *J. Mol. Neurosci.* 30, 107–108.

Ganio, E., Ratto, C., Masin, A., Luc, A.R., Doglietto, G.B., Dodi, G., Ripetti, V., Arullani, A., Frascio, M., BertiRiboli, E., et al. (2001). Neuromodulation for fecal incontinence: outcome in 16 patients with definitive implant. The initial Italian Sacral Neurostimulation Group (GINS) experience. *Dis. Colon Rectum* 44, 965–970.

Garrod, D.R., Merritt, A.J., and Nie, Z. (2002). Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 537–545.

Geboes, K., and Collins, S. (1998). Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* 10, 189–202.

George, A.T., Kalmar, K., Panarese, A., Dudding, T.C., Nicholls, R.J., and Vaizey, C.J. (2012). Long-term outcomes of sacral nerve stimulation for fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum* 55, 302–306.

Gershon, M.D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 101–109.

Ghia, J.E., Blennerhassett, P., Kumar-Ondiveeran, H., Verdu, E.F., and Collins, S.M. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 131, 1122–1130.

De Giorgio, R., Giancola, F., Boschetti, E., Abdo, H., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2012). Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G887–893.

Gooneratne, M.L., Facer, P., Knowles, C.H., Chan, C.L., Lunniss, P.J., Scott, S.M., Anand, P., and Williams, N.S. (2008). Normalization of substance P levels in rectal mucosa of patients with faecal incontinence treated successfully by sacral nerve stimulation. *Br J Surg* 95, 477–483.

Gourcerol, G., Gallas, S., Michot, F., Denis, P., and Leroi, A.-M. (2007). Sacral nerve stimulation in fecal incontinence: are there factors associated with success? *Dis. Colon Rectum* 50, 3–12.

Gourcerol, G., Vitton, V., Leroi, A.M., Michot, F., Abysique, A., and Bouvier, M. (2011). How sacral nerve stimulation works in patients with faecal incontinence. *Colorectal Dis* 13, e203–211.

Govaert, B., Melenhorst, J., Nieman, F.H.M., Bols, E.M.J., Van Gemert, W.G., and Baeten, C.G. (2009). Factors associated with percutaneous nerve evaluation and permanent sacral nerve modulation outcome in patients with fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum* 52, 1688–1694.

Govaert, B., Melenhorst, J., Van Kleef, M., Van Gemert, W.G., and Baeten, C.G. (2010). Sacral neuromodulation for the treatment of chronic functional anorectal pain: a single center experience. *Pain Pract* 10, 49–53.

De Groat, W.C., and Krier, J. (1978). The sacral parasympathetic reflex pathway regulating colonic motility and defaecation in the cat. *J. Physiol. (Lond.)* 276, 481–500.

Gstaltner, K., Rosen, H., Hufgard, J., Märk, R., and Schrei, K. (2008). Sacral nerve stimulation as an option for the treatment of faecal incontinence in patients suffering from cauda equina syndrome. *Spinal Cord* 46, 644–647.

Handforth, A., DeGiorgio, C.M., Schachter, S.C., Uthman, B.M., Naritoku, D.K., Tecoma, E.S., Henry, T.R., Collins, S.D., Vaughn, B.V., Gilmartin, R.C., et al. (1998). Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology* 51, 48–55.

Hansen, M.B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.

Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 466–479.

Hetzer, F.H., Hahnloser, D., Knoblauch, Y., Löhlein, F., and Demartines, N. (2005). New screening technique for sacral nerve stimulation under local anaesthesia. *Tech Coloproctol* 9, 25–28.

- Hoepfner, J., Crnogorac, V., Hopt, U.T., and Weiser, H.-F. (2009). The pig as an experimental model for colonic healing study of leakage and ischemia in colonic anastomosis. *J Invest Surg* 22, 281–285.
- Hollingshead, J.R.F., Dudding, T.C., and Vaizey, C.J. (2011). Sacral nerve stimulation for faecal incontinence: results from a single centre over a 10-year period. *Colorectal Dis* 13, 1030–1034.
- Holzer, B., Rosen, H.R., Novi, G., Ausch, C., Hölbling, N., and Schiessel, R. (2007). Sacral nerve stimulation for neurogenic faecal incontinence. *Br J Surg* 94, 749–753.
- Holzer, B., Rosen, H.R., Zaglmaier, W., Klug, R., Beer, B., Novi, G., and Schiessel, R. (2008). Sacral nerve stimulation in patients after rectal resection--preliminary report. *J. Gastrointest. Surg.* 12, 921–925.
- Huston, J.M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V.A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C.J., Foxwell, B., et al. (2006). Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* 203, 1623–1628.
- Jarrett, M.E.D., Mowatt, G., Glazener, C.M.A., Fraser, C., Nicholls, R.J., Grant, A.M., and Kamm, M.A. (2004). Systematic review of sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation. *Br J Surg* 91, 1559–1569.
- Jarrett, M.E.D., Matzel, K.E., Christiansen, J., Baeten, C.G.M.I., Rosen, H., Bittorf, B., Stösser, M., Madoff, R., and Kamm, M.A. (2005). Sacral nerve stimulation for faecal incontinence in patients with previous partial spinal injury including disc prolapse. *Br J Surg* 92, 734–739.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci.* 3, 2206–2218.
- Jiang, M.M., and Surprenant, A. (1992). Re-innervation of submucosal arterioles by myenteric neurones following extrinsic denervation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 37, 145–154.
- Jorge, J.M., and Wexner, S.D. (1993). Etiology and management of fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum* 36, 77–97.
- Kamm, M.A., Dudding, T.C., Melenhorst, J., Jarrett, M., Wang, Z., Buntzen, S., Johansson, C., Laurberg, S., Rosen, H., Vaizey, C.J., et al. (2010). Sacral nerve stimulation for intractable constipation. *Gut* 59, 333–340.
- Kelsh, R.N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* 28, 788–798.
- Kenefick, N.J., and Christiansen, J. (2004). A review of sacral nerve stimulation for the treatment of faecal incontinence. *Colorectal Dis* 6, 75–80.
- Kenefick, N.J., Nicholls, R.J., Cohen, R.G., and Kamm, M.A. (2002a). Permanent sacral nerve stimulation for treatment of idiopathic constipation. *Br J Surg* 89, 882–888.
- Kenefick, N.J., Vaizey, C.J., Cohen, R.C.G., Nicholls, R.J., and Kamm, M.A. (2002b). Medium-term results of permanent sacral nerve stimulation for faecal incontinence. *Br J Surg* 89, 896–901.

- Kessler, T.M., Madersbacher, H., and Kiss, G. (2005). Prolonged sacral neuromodulation testing using permanent leads: a more reliable patient selection method? *Eur. Urol.* *47*, 660–665.
- Kirchgessner, A.L., Tamir, H., and Gershon, M.D. (1992). Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci.* *12*, 235–248.
- Knowles, C.H., and Martin, J.E. (2000). Slow transit constipation: a model of human gut dysmotility. Review of possible aetiologies. *Neurogastroenterol.Motil.* *12*, 181–196.
- Knowles, C.H., Thin, N., Gill, K., Bhan, C., Grimmer, K., Lunniss, P.J., Williams, N.S., and Scott, S.M. (2012). Prospective randomized double-blind study of temporary sacral nerve stimulation in patients with rectal evacuatory dysfunction and rectal hyposensitivity. *Ann. Surg.* *255*, 643–649.
- Koch, S.M.P., Van Gemert, W.G., and Baeten, C.G.M.I. (2005). Determination of therapeutic threshold in sacral nerve modulation for faecal incontinence. *Br J Surg* *92*, 83–87.
- Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* *10 Suppl 1*, S72–77.
- Laharie, D., Ménard, S., Asencio, C., Vidal-Martinez, T., Rullier, A., Zerbib, F., Candalh, C., Mégraud, F., Heyman, M., and Matysiak-Budnik, T. (2007). Effect of rebamipide on the colonic barrier in interleukin-10-deficient mice. *Dig. Dis. Sci.* *52*, 84–92.
- Lakomy, M., Häppölä, O., Majewski, M., and Wasowicz, K. (1993). Neuropeptides in the porcine coeliac-superior mesenteric ganglion. *Folia Histochem.Cytobiol.* *31*, 181–191.
- Lakomy, M., Häppölä, O., and Wasowicz, K. (1994). Immunohistochemical colocalization of Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 with tyrosine hydroxylase in neurons of the porcine inferior mesenteric and coeliac-superior mesenteric ganglia. *Folia Histochem.Cytobiol.* *32*, 225–230.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* *121*, 3412–3424.
- Lelièvre, V., Meunier, A.C., Caigneaux, E., Falcon, J., and Muller, J.M. (1998). Differential expression and function of PACAP and VIP receptors in four human colonic adenocarcinoma cell lines. *Cell. Signal.* *10*, 13–26.
- Leroi, A.M., Damon, H., Faucheron, J.L., Lehur, P.A., Siproudhis, L., Slim, K., Barbieux, J.P., Barth, X., Borie, F., Bresler, L., et al. (2009). Sacral nerve stimulation in faecal incontinence: position statement based on a collective experience. *Colorectal Dis* *11*, 572–583.
- Linden, D.R., Sharkey, K.A., and Mawe, G.M. (2003). Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J. Physiol. (Lond.)* *547*, 589–601.
- Lindgren, S., Stewenius, J., Sjölund, K., Lilja, B., and Sundkvist, G. (1993). Autonomic vagal nerve dysfunction in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* *28*, 638–642.
- Lomax, A.E., Mawe, G.M., and Sharkey, K.A. (2005). Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)* *564*, 863–875.

- Lomax, A.E., Sharkey, K.A., and Furness, J.B. (2010). The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. *Neurogastroenterol.Motil.*22, 7–18.
- Lubbers, T., Buurman, W., and Luyer, M. (2010). Controlling postoperative ileus by vagal activation. *World J. Gastroenterol.*16, 1683–1687.
- Lundby, L., Krogh, K., Buntzen, S., and Laurberg, S. (2008). Temporary sacral nerve stimulation for treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dis. Colon Rectum* 51, 1074–1078.
- Lundgren, O., Jodal, M., Jansson, M., Ryberg, A.T., and Svensson, L. (2011). Intestinal epithelial stem/progenitor cells are controlled by mucosal afferent nerves. *PLoS ONE* 6, e16295.
- Madara, J.L. (1990). Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions. *J. Membr. Biol.* 116, 177–184.
- Madsen, K.L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J.S., Jewell, L.D., and Fedorak, R.N. (1999). Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm. Bowel Dis.* 5, 262–270.
- Maeda, Y., and Laurberg, S. (2011). Sacral nerve stimulation: time for critical appraisal. *Ann. Surg.* 254, 174–175; author reply 175–176.
- Maeda, Y., Lundby, L., Buntzen, S., and Laurberg, S. (2011a). Suboptimal outcome following sacral nerve stimulation for faecal incontinence. *Br J Surg* 98, 140–147.
- Maeda, Y., Matzel, K., Lundby, L., Buntzen, S., and Laurberg, S. (2011b). Postoperative issues of sacral nerve stimulation for fecal incontinence and constipation: a systematic literature review and treatment guideline. *Dis. Colon Rectum* 54, 1443–1460.
- Marc Rhoads, J., and Wu, G. (2009). Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37, 111–122.
- Marcelissen, T., Van Kerrebroeck, P., and De Wachter, S. (2010). Sacral neuromodulation as a treatment for neuropathic clitoral pain after abdominal hysterectomy. *Int Urogynecol J* 21, 1305–1307.
- Marshall, J.K., Thabane, M., Garg, A.X., Clark, W., Meddings, J., and Collins, S.M. (2004). Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment.Pharmacol.Ther.*20, 1317–1322.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91–98.
- Mathis, C., Schikowski, A., Thewissen, M., Ross, H.-G., Crowell, M.D., and Enck, P. (2002). Influences of pelvic floor structures and sacral innervation on the response to distension of the cat rectum. *Neurogastroenterol.Motil.*14, 265–270.
- Matricon, J., Meleine, M., Gelot, A., Piche, T., Dapoigny, M., Muller, E., and Ardid, D. (2012). Review article: associations between immune activation, intestinal permeability and the irritable bowel syndrome. *Aliment.Pharmacol.Ther.*36, 1009–1031.
- Matzel, K.E., Stadelmaier, U., Hohenfellner, M., and Gall, F.P. (1995). Electrical stimulation of sacral spinal nerves for treatment of faecal incontinence. *Lancet* 346, 1124–1127.

- Matzel, K.E., Stadelmaier, U., Hohenfellner, M., and Hohenberger, W. (2001). Chronic sacral spinal nerve stimulation for fecal incontinence: long-term results with foramen and cuff electrodes. *Dis. Colon Rectum* 44, 59–66.
- Matzel, K.E., Stadelmaier, U., Bittorf, B., Hohenfellner, M., and Hohenberger, W. (2002). Bilateral sacral spinal nerve stimulation for fecal incontinence after low anterior rectum resection. *Int J Colorectal Dis* 17, 430–434.
- Matzel, K.E., Kamm, M.A., Stösser, M., Baeten, C.G.M.I., Christiansen, J., Madoff, R., Mellgren, A., Nicholls, R.J., Rius, J., and Rosen, H. (2004). Sacral spinal nerve stimulation for faecal incontinence: multicentre study. *Lancet* 363, 1270–1276.
- Maudlej, N., and Hanani, M. (1992). Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res.* 578, 94–98.
- Mazzuoli, G., and Schemann, M. (2012). Mechanosensitive enteric neurons in the myenteric plexus of the mouse intestine. *PLoS ONE* 7, e39887.
- McJunkin, T.L., Wuollet, A.L., and Lynch, P.J. (2009). Sacral nerve stimulation as a treatment modality for intractable neuropathic testicular pain. *Pain Physician* 12, 991–995.
- Melenhorst, J., Koch, S.M., Uludag, O., Van Gemert, W.G., and Baeten, C.G. (2008). Is a morphologically intact anal sphincter necessary for success with sacral nerve modulation in patients with faecal incontinence? *Colorectal Dis* 10, 257–262.
- Mellgren, A., Wexner, S.D., Collier, J.A., Devroede, G., Lerew, D.R., Madoff, R.D., and Hull, T. (2011). Long-term efficacy and safety of sacral nerve stimulation for fecal incontinence. *Dis. Colon Rectum* 54, 1065–1075.
- Meurette, G., La Torre, M., Regenet, N., Robert-Yap, J., and Lehur, P.A. (2009). Value of sacral nerve stimulation in the treatment of severe faecal incontinence: a comparison to the artificial bowel sphincter. *Colorectal Dis* 11, 631–635.
- Meurette, G., Wong, M., Paye, F., Parc, Y., Tiret, E., and Lehur, P.-A. (2011). Sacral nerve stimulation for the treatment of faecal incontinence after ileal pouch anal anastomosis. *Colorectal Dis* 13, e182–183.
- Michelsen, H.B., Krogh, K., Buntzen, S., and Laurberg, S. (2008). A prospective, randomized study: switch off the sacral nerve stimulator during the night? *Dis. Colon Rectum* 51, 538–540.
- De Miguel, M., Oteiza, F., Ciga, M.A., Armendáriz, P., Marzo, J., and Ortiz, H. (2011). Sacral nerve stimulation for the treatment of faecal incontinence following low anterior resection for rectal cancer. *Colorectal Dis* 13, 72–77.
- Møller, F.V., Buntzen, S., Rijkhoff, N.J.M., and Laurberg, S. (2008). Pelvic nerve stimulation evokes nitric oxide mediated distal rectal relaxation in pigs. *Dis. Colon Rectum* 51, 1261–1267.
- Morris, G.L., 3rd, and Mueller, W.M. (1999). Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology* 53, 1731–1735.
- Mowatt, G., Glazener, C., and Jarrett, M. (2007). Sacral nerve stimulation for faecal incontinence and constipation in adults. *Cochrane Database Syst Rev* CD004464.

- Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10, 336–340.
- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V., and 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, 5151–5160.
- Neunlist, M., and Schemann, M. (1998). Polarised innervation pattern of the mucosa of the guinea pig distal colon. *Neurosci.Lett.* 246, 161–164.
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and 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, G1028–1036.
- Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P.A., Schemann, M., and Galmiche, J.P. (2003b). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52, 84–90.
- Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., et al. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G231–241.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Bourreille, A., and Savidge, T. (2008). Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 577–583.
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bruley des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2012). The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*
- Nieset, J.E., Redfield, A.R., Jin, F., Knudsen, K.A., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1997). Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J. Cell. Sci.* 110 ( Pt 8), 1013–1022.
- Norton, C., and Cody, J.D. (2012). Biofeedback and/or sphincter exercises for the treatment of faecal incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 7, CD002111.
- O’Bichere, A., Shurey, S., Sibbons, P., Green, C., and Phillips, R.K. (2000). Experimental model of anorectal transplantation. *Br J Surg* 87, 1534–1539.
- Oerlemans, D.J.A.J., and Van Kerrebroeck, P.E.V. (2008). Sacral nerve stimulation for neuromodulation of the lower urinary tract. *Neurourol.Urodyn.* 27, 28–33.
- Olofsson, P.S., Rosas-Ballina, M., Levine, Y.A., and Tracey, K.J. (2012). Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol. Rev.* 248, 188–204.
- Paillusson, S., Clairembault, T., Biraud, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2012). Activity-dependent secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J. Neurochem.*
- Patsos, G., and Corfield, A. (2009). Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol. Chem.* 390, 581–590.

- Peters, K.M. (2012). Sacral neuromodulation is an effective treatment for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: pro. *J. Urol.* *188*, 2043–2044.
- Pham, K., Guralnick, M.L., and O'Connor, R.C. (2008). Unilateral versus bilateral stage I neuromodulator lead placement for the treatment of refractory voiding dysfunction. *Neurourol. Urodyn.* *27*, 779–781.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galimiche, J.P., et al. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* *58*, 196–201.
- Pidsudko, Z., Kaleczyc, J., Majewski, M., Lakomy, M., Scheuermann, D.W., and Timmermans, J.P. (2001). Differences in the distribution and chemical coding between neurons in the inferior mesenteric ganglion supplying the colon and rectum in the pig. *Cell Tissue Res.* *303*, 147–158.
- Pirenne, J., Benedetti, E., Gruessner, A., Moon, C., Hakim, N., Fryer, J.P., Troppmann, C., Nakhleh, R.E., and Gruessner, R.W. (1996). Combined transplantation of small and large bowel. FK506 versus cyclosporine A in a porcine model. *Transplantation* *61*, 1685–1694.
- Plaisancié, P., Barcelo, A., Moro, F., Claustre, J., Chayvialle, J.A., and Cuber, J.C. (1998). Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am. J. Physiol.* *275*, G1073–1084.
- Podolsky, D.K. (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am. J. Physiol.* *277*, G495–499.
- Pohl, J., Borgulya, M., Lorenz, D., and Ell, C. (2010). Endoscopic closure of postoperative esophageal leaks with a novel over-the-scope clip system. *Endoscopy* *42*, 757–759.
- Potten, C.S. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol.* *273*, G253–257.
- Potten, C.S., and Grant, H.K. (1998). The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br. J. Cancer* *78*, 993–1003.
- Prochnow, N., and Dermietzel, R. (2008). Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 71–77.
- Ramsay, L.B., Wright, J., Jr, and Fischer, J.R. (2009). Sacral neuromodulation in the treatment of vulvar vestibulitis syndrome. *Obstet Gynecol* *114*, 487–489.
- Ratto, C., Litta, F., Parello, A., Donisi, L., De Simone, V., and Zaccone, G. (2012). Sacral nerve stimulation in faecal incontinence associated with an anal sphincter lesion: a systematic review. *Colorectal Dis* *14*, e297–304.
- Rettig, T., and Halata, Z. (1990). Structure of the sensory innervation of the anal canal in the pig. A light- and electron-microscopical study. *Acta Anat (Basel)* *137*, 189–201.
- Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C., and Solcia, E. (2004). The “normal” endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 1–12.
- Rockwood, T.H., Church, J.M., Fleshman, J.W., Kane, R.L., Mavrantonis, C., Thorson, A.G., Wexner, S.D., Bliss, D., and Lowry, A.C. (1999). Patient and surgeon ranking of the severity of symptoms

- associated with fecal incontinence: the fecal incontinence severity index. *Dis. Colon Rectum* **42**, 1525–1532.
- Rodríguez, L., Rodriguez, P., Gómez, B., Ayala, J.C., Saba, J., Perez-Castilla, A., Galvao Neto, M., and Crowell, M.D. (2012). Electrical stimulation therapy of the lower esophageal sphincter is successful in treating GERD: final results of open-label prospective trial. *Surg Endosc.*
- Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., et al. (2011). Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**, 98–101.
- Rosen, H.R., Urbarz, C., Holzer, B., Novi, G., and Schiessel, R. (2001). Sacral nerve stimulation as a treatment for fecal incontinence. *Gastroenterology* **121**, 536–541.
- Rühl, A., Franzke, S., Collins, S.M., and Stremmel, W. (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G1163–1171.
- Rullier, E., Zerbib, F., Marrel, A., Amouretti, M., and Lehur, P.-A. (2004). Validation of the French version of the Fecal Incontinence Quality-of-Life (FIQL) scale. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **28**, 562–568.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* **40**, 915–920.
- Santoro, G.A., Infantino, A., Cancian, L., Battistella, G., and Di Falco, G. (2012). Sacral nerve stimulation for fecal incontinence related to external sphincter atrophy. *Dis. Colon Rectum* **55**, 797–805.
- Saunders, P.R., Hanssen, N.P., and Perdue, M.H. (1997). Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Physiol.* **273**, G486–490.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* **16 Suppl 1**, 55–59.
- Schneider, J., Jehle, E.C., Starlinger, M.J., Neunlist, M., Michel, K., Hoppe, S., and 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**, 255–264.
- Shafik, A., El-Sibai, O., and Ahmed, I. (2002). Parasympathetic extrinsic reflex: role in defecation mechanism. *World J Surg* **26**, 737–740; discussion 741.
- Shafik, A., Shafik, A.A., El-Sibai, O., and Ahmed, I. (2003). Role of sympathetic innervation in the defecation mechanism: a novel concept of its function. *J Spinal Cord Med* **26**, 150–154.
- Söderholm, J.D., Yang, P.-C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* **123**, 1099–1108.

- Spinelli, M., Giardiello, G., Arduini, A., and Van den Hombergh, U. (2003). New percutaneous technique of sacral nerve stimulation has high initial success rate: preliminary results. *Eur. Urol.* *43*, 70–74.
- Srivastava, D. (2012). Efficacy of sacral neuromodulation in treating chronic pain related to painful bladder syndrome/interstitial cystitis in adults. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* *28*, 428–435.
- Ter Steege, R.W.F., and Kolkman, J.J. (2012). Review article: the pathophysiology and management of gastrointestinal symptoms during physical exercise, and the role of splanchnic blood flow. *Aliment.Pharmacol.Ther.* *35*, 516–528.
- Steinkamp, M., Geerling, I., Seufferlein, T., Von Boyen, G., Egger, B., Grossmann, J., Ludwig, L., Adler, G., and Reinshagen, M. (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* *124*, 1748–1757.
- Sturm, A., and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *14*, 348–353.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D.R., Nalle, S.C., Sullivan, E.A., Meddings, J.B., Abraham, C., and Turner, J.R. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* *136*, 551–563.
- Tang, D.M., and Friedenberg, F.K. (2011). Gastroparesis: approach, diagnostic evaluation, and management. *Dis Mon* *57*, 74–101.
- The, F.O., Boeckstaens, G.E., Snoek, S.A., Cash, J.L., Bennink, R., Larosa, G.J., Van den Wijngaard, R.M., Greaves, D.R., and De Jonge, W.J. (2007). Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* *133*, 1219–1228.
- Thomas, G.P., Dudding, T.C., Rahbour, G., Nicholls, R.J., and Vaizey, C.J. (2013). Sacral nerve stimulation for constipation. *Br J Surg* *100*, 174–181.
- Tong, W.D., Ridolfi, T.J., Kosinski, L., Ludwig, K., and Takahashi, T. (2010). Effects of autonomic nerve stimulation on colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* *22*, 688–693.
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol.Motil.* *15*, 239–242.
- Tracey, K.J. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* *117*, 289–296.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 285–293.
- Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 799–809.
- Uludağ, O., Koch, S.M.P., Van Gemert, W.G., Dejong, C.H.C., and Baeten, C.G.M.I. (2004). Sacral neuromodulation in patients with fecal incontinence: a single-center study. *Dis. Colon Rectum* *47*, 1350–1357.

Vaizey, C.J., Kamm, M.A., Turner, I.C., Nicholls, R.J., and Woloszko, J. (1999). Effects of short term sacral nerve stimulation on anal and rectal function in patients with anal incontinence. *Gut* 44, 407–412.

Vanner, S., and Surprenant, A. (1991). Cholinergic and noncholinergic submucosal neurons dilate arterioles in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 261, G136–144.

Videla, S., Lugea, A., Vilaseca, J., Guarner, F., Treserra, F., Salas, A., Crespo, E., Medina, C., and Malagelada, J.R. (2007). Polyethylene glycol enhances colonic barrier function and ameliorates experimental colitis in rats. *Int J Colorectal Dis* 22, 571–580.

Vitton, V., Gigout, J., Grimaud, J.-C., Bouvier, M., Desjeux, A., and Orsoni, P. (2008a). Sacral nerve stimulation can improve continence in patients with Crohn's disease with internal and external anal sphincter disruption. *Dis. Colon Rectum* 51, 924–927.

Vitton, V., Abysique, A., Gaigé, S., Leroi, A.-M., and Bouvier, M. (2008b). Colonosphincteric electromyographic responses to sacral root stimulation: evidence for a somatosympathetic reflex. *Neurogastroenterol.Motil.*20, 407–416.

Wang, G.-J., Yang, J., Volkow, N.D., Telang, F., Ma, Y., Zhu, W., Wong, C.T., Tomasi, D., Thanos, P.K., and Fowler, J.S. (2006). Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15641–15645.

Ward, S.M., Sanders, K.M., and Hirst, G.D.S. (2004). Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol.Motil.*16 *Suppl* 1, 112–117.

Wedel, T., Krammer, H.J., Kühnel, W., and 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.

Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2006). Paneth cells and the innate immune response. *Curr.Opin.Gastroenterol.*22, 644–650.

Van Westerloo, D.J., Giebelen, I.A., Florquin, S., Bruno, M.J., Larosa, G.J., Ulloa, L., Tracey, K.J., and Van der Poll, T. (2006). The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 130, 1822–1830.

Wexner, S.D., Collier, J.A., Devroede, G., Hull, T., McCallum, R., Chan, M., Ayscue, J.M., Shobeiri, A.S., Margolin, D., England, M., et al. (2010). Sacral nerve stimulation for fecal incontinence: results of a 120-patient prospective multicenter study. *Ann. Surg.* 251, 441–449.

Wojtkiewicz, J., Równiak, M., Crayton, R., Barczewska, M., Bładowski, M., Robak, A., Pidsudko, Z., and Majewski, M. (2012). Inflammation-induced changes in the chemical coding pattern of colon-projecting neurons in the inferior mesenteric ganglia of the pig. *J. Mol. Neurosci.* 46, 450–458.

Wong, M.T.C., Meurette, G., Rodat, F., Regenet, N., Wyart, V., and Lehur, P.-A. (2011). Outcome and management of patients in whom sacral nerve stimulation for fecal incontinence failed. *Dis. Colon Rectum* 54, 425–432.

WOODBURNE, R.T. (1956). The sacral parasympathetic innervation of the colon. *Anat. Rec.* 124, 67–76.

Young, H.M., Anderson, R.B., and Anderson, C.R. (2004). Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 112, 1–14.

Zalecki, M., Podlasz, P., Pidsudko, Z., Wojtkiewicz, J., and Kaleczyc, J. (2012). Vagal projections to the pylorus in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Auton Neurosci* 171, 21–27.

Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.-C., Ngan, B.-Y., McKay, D.M., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., and Sherman, P.M. (2006). Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55, 1553–1560.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56, 61–72.

## Résumé

**Introduction :** Les lésions de la barrière épithéliale intestinale (BEI) sont impliquées dans les pathologies digestives. La neurostimulation digestive peut avoir une influence sur la BEI. Si la stimulation des racines sacrées (SRS) s'est développée en clinique, son effet sur la BEI n'a pas encore été démontré.

**Objectifs de la thèse :** Développer un modèle préclinique porcin de SRS ; évaluer les effets de la stimulation aiguë; mettre au point des techniques de biopsies profondes en endoscopie pour une étude couplée de la BEI et du système nerveux entérique dans les différentes couches de la paroi colique ; évaluer les effets à plus long terme (7 jours) de la SRS; enfin évaluer chez l'homme les effets de la SRS dans la rectite inflammatoire.

**Résultats :** Nous avons montré que la SRS réduisait à court terme (3 heures) la perméabilité paracellulaire (*article 1*). Nous avons ensuite montré la faisabilité de la réalisation de biopsies coliques panpariétales en endoscopie (*article 2*). Nous avons montré que la SRS à plus long terme (7 jours) ne modifiait plus la perméabilité para-cellulaire, mais prévenait l'augmentation de la perméabilité en situation de stress (adjonction d'un agoniste PAR(2) ; absence de diminution de l'expression de ZO-1). Parallèlement la SRS diminuait l'expression de mRNA d'IL-6 dans un modèle de stress ischémique (culture organotypique)(*article 3 soumis*). La transmission neuromusculaire était également modifiée avec une hyperexcitabilité neuronale. Enfin, dans un cas clinique (*article 4 soumis*) la SRS avait un effet thérapeutique chez un patient atteint de rectocolite hémorragique (RCH).

**Conclusion :** Notre étude a permis de constituer un modèle porcin de SRS indispensable à l'évaluation de ses effets sur la muqueuse rectale et la BEI. Nous avons montré un renforcement de sa perméabilité à un stade précoce de stimulation, puis à long terme une normalisation de la perméabilité, mais en maintenant une diminution de la sensibilité de la BEI à l'agression. Nous avons rapporté un cas clinique de RCH améliorée par la SRS.

## Abstract

**Aims :** Although sacral nerve stimulation (SNS) is a validated treatment option for severe fecal incontinence, its mechanisms of action are poorly understood. The aim of our study has been to develop a preclinical porcine model of SNS and to characterize its effects upon the rectal mucosa in acute and chronic period of stimulation in terms of intestinal barrier permeability and inflammatory response.

**Methods :** A total of 34 animals have been included. Successively, acute 3 hour-period (n=18) and a chronic 7 day-stimulation (n=14) periods have been tested. Rectal biopsies were performed before and after 3h / 7 days stimulation. Paracellular permeability, mucosal morphology, inflammatory cytokines and junction protein have been assessed. Moreover, we evaluated feasibility of colonic full thickness biopsies using dedicated device for wall defect closing, to study the enteric nervous system and intestinal barrier. Finally we report the case of distal ulcerative colitis successfully treated with SNS

**Results :** After 3-hour stimulation (*article 1*), SNS lead to significant decreasing in rectal barrier permeability, mucosal thickness and mucous discharge (p=0.03). Bilateral stimulation emphasized this effect as compared to unilateral. After 7-day stimulation (*article 2*) prevented permeability from increasing after in vitro PAR-2 agonist addition, decreased the IL-6 cytokine mucosal expression in organotypic culture model (p=0.03) and decreased systemic inflammatory response. Full thickness colonic biopsies are feasible, with complete enteric nervous system and intestinal barrier assessment.

**Conclusion:** Our study confirmed that SNS targeted rectal intestinal barrier properties, and lead to reinforcement of intestinal barrier in response to inflammatory stress. Further indications in inflammatory bowel disease must be considered