

Université de Montréal

**Expression de PSA-NCAM dans le système nerveux  
entérique chez le rat au cours du développement et au  
cours de la réponse inflammatoire**

Par  
Catherine Rhéaume

11678365



Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en pathologie et biologie cellulaire

Avril 2005

© Catherine Rhéaume, 2005





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

À MA FAMILLE ET MES AMIS,  
CE MÉMOIRE EST L'ACCOMPLISSEMENT DU  
SOUTIEN CONSTANT ET INESTIMABLE QUE  
VOUS M'AVEZ APPORTÉ.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression de PSA-NCAM dans le système nerveux  
entérique chez le rat au cours du développement et au  
cours de la réponse inflammatoire**

Présenté par :

Catherine Rhéaume

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Michaud (MD)  
Président-rapporteur

Dr Christophe Faure (MD)  
Directeur de recherche

Dr Moïse Bendayan (Ph.D)  
Codirecteur

Dr Ernest Seidman (MD)  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

---

**Introduction:** PSA-NCAM est exprimé dans le système nerveux central en développement et son expression diminue avec l'âge. Certaines zones dans le cerveau adulte, caractérisées par des capacités de régénération et de plasticité, continuent d'exprimer PSA-NCAM. **Hypothèse:** L'expression de PSA-NCAM n'a jamais été étudiée dans le système nerveux entérique (SNE) et nous pensons que cette molécule d'adhésion polysialylée pourrait être exprimée dans le SNE du rat au cours du développement et qu'elle pourrait jouer un rôle au cours de la réponse inflammatoire. **Méthodes:** L'immunofluorescence sur des coupes congelées et des préparations entières d'intestins de rats de différents âges (foetal E12 à E20; postnatal P1 à P90) a été utilisée pour vérifier notre hypothèse. Des anticorps contre PSA-NCAM et NCAM ont été utilisés en conjonction de divers marqueurs cellulaires (PGP9.5, S100b, anti-desmine). Les colites ont été induites par injection intra rectale de 2,4,6 trinitrobenzène (TNBS) dans le côlon des rats adultes (P60 et plus). L'expression de PSA-NCAM a été évaluée après 1, 3, 7 et 21 jours. **Résultats:** SNE en développement: Chez l'embryon (E12 à E20), PSA-NCAM est exprimé par les neurones entériques ainsi que par le mésenchyme et le muscle lisse (E16-E18). PSA-NCAM reste fortement exprimé dans les plexus sous-muqueux et myentériques de P1 à P7. De P14 à P28, son expression se restreint au plexus myentérique, après quoi elle diminue de sorte que chez l'adulte (P60 à P90), PSA-NCAM est presque absent. Réponse inflammatoire: L'induction de colite engendre la réexpression de PSA-NCAM 3 jours après l'induction des colites. **Conclusion:** L'expression de PSA-NCAM dans le SNE varie en fonction de l'âge. L'inflammation colique induit une réexpression de PSA-NCAM par les neurones myentériques suggérant un rôle fonctionnel pour PSA-NCAM dans l'adaptation et la plasticité du SNE mature.

**Mots clés:** PSA-NCAM • développement • colite • système nerveux entérique  
• NCAM • inflammation • cellule gliale

## SUMMARY

---

**Introduction:** PSA-NCAM is expressed in the developing nervous system and is diminished with ageing. However, those areas in the adult brain that possess greater plasticity and regenerative abilities still express PSA-NCAM. **Hypothesis:** PSA-NCAM expression has never been studied in the enteric nervous system (ENS) and we think that this polysialylated adhesion molecule could be expressed in the developing rat ENS and that it may play a role in the inflammatory response. **Methods:** Immunofluorescence studies on frozen sections and whole-mount preparations of rat intestine of different ages (foetal E12 to E20; postnatal P1 to P90) were used to test our hypothesis. Antibodies directed against PSA-NCAM and NCAM were used in conjunction with antibodies to a variety of cellular marker (PGP9.5, S100b, anti-desmin). Colitis was induced by injection of 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid solution (TNBS) in colon of adult rats (P60 or older). PSA-NCAM expression was assessed after 1, 3, 7 and 21 days. **Results:** Developing ENS: In embryos (E12 to E20), PSA-NCAM is expressed by enteric neurons as well as by the mesenchyme and smooth muscle (E16-E18). PSA-NCAM is strongly expressed in both the submucosal and myenteric plexuses from P1 to P7. From P14 until P28, its expression is restricted to the myenteric plexus, after which it decreases so that by adulthood (P60-P90), PSA-NCAM is practically absent. Inflammatory response: The induction of colitis caused the re-expression of PSA-NCAM during the early phase of the disease (day 3). **Conclusion:** Enteric neurons express PSA-NCAM in a time-dependent manner. Colitis induces re-expression of PSA-NCAM by myenteric neurons suggesting a functional role for PSA-NCAM in adaptation and plasticity of the mature ENS.

**Key words:** PSA-NCAM • development • colitis • enteric nervous system • NCAM • inflammation, glial cell

## TABLE DES MATIÈRES

---

TITRE .....	i
IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
RÉSUMÉ .....	iii
SUMMARY .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	x
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiv
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Le système nerveux entérique .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Structure du SNE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Fonctions du SNE .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Arcs réflexes du SNE .....</b>	<b>8</b>



<b>1.4</b>	<b>Développement du SNE .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Les crêtes neurales .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Colonisation du SNE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Différentiation des cellules issues des crêtes neurales .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.4</b>	<b>Les facteurs neurotrophiques .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.5</b>	<b>Facteurs neurotrophiques de la famille GDNF .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.6</b>	<b>Facteurs neurotrophiques de la famille des neurotrophines .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Plasticité postnatale du SNE .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6</b>	<b>Conséquences de l'inflammation sur le SNE .....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>NCAM et PSA-NCAM .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Structure de NCAM .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Structure de PSA-NCAM .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Régulation de l'expression de PSA-NCAM .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Fonctions de NCAM et de PSA-NCAM .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4.1</b>	<b>L'adhésion cellulaire .....</b>	<b>25</b>

2.4.2	La signalisation intracellulaire .....	27
2.4.2.1	NCAM et la signalisation .....	27
2.4.2.2	PSA-NCAM et la signalisation .....	29
2.5	Rôles de NCAM et de PSA-NCAM dans le SNC : étude des souris mutantes .....	29
2.5.1	Souris mutantes pour NCAM .....	30
2.5.2	Souris mutantes pour l'enzyme PST .....	33
3.	Objectifs de l'étude .....	35
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	37
1.	Animaux .....	38
2.	Préparation des tissus .....	39
2.1	Préparation des tissus pour la microscopie optique .....	39
2.2	Préparation des tissus pour la microscopie électronique ...	40
3.	Induction des colites .....	41
4.	Évaluation de la sévérité des colites .....	42
5.	Immunofluorescence .....	44

6.	<b>Immunocytochimie à l'or colloïdal .....</b>	<b>46</b>
7.	<b>Comptage cellulaire .....</b>	<b>48</b>
8.	<b>Analyses statistiques .....</b>	<b>49</b>
<b>III.</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>50</b>
1.	<b>Expression de PSA-NCAM et de NCAM au cours du développement du SNE .....</b>	<b>51</b>
1.1	<b>L'expression de PSA-NCAM dans l'intestin augmente au cours du développement de l'embryon .....</b>	<b>51</b>
1.2	<b>Le mésenchyme et le muscle lisse expriment transitoirement PSA-NCAM chez l'embryon .....</b>	<b>54</b>
1.3	<b>L'expression de PSA-NCAM dans le SNE diminue progressivement après la naissance .....</b>	<b>56</b>
1.4	<b>NCAM est exprimé sur les neurones et les cellules gliales entériques tant au cours du développement que chez l'adulte et est aussi exprimé transitoirement sur le muscle lisse chez l'embryon .....</b>	<b>61</b>
2.	<b>Expression de PSA-NCAM au cours de la réponse à l'inflammation colique .....</b>	<b>65</b>
2.1	<b>Les rats injectés avec une solution saline sont normaux et les neurones entériques n'expriment pas PSA-NCAM .....</b>	<b>65</b>

2.2	L'éthanol 50% cause de l'inflammation mais n'induit pas une réexpression significative de PSA-NCAM par les neurones entériques .....	65
2.3	Le TNBS provoque une forte réponse inflammatoire et induit la réexpression transitoire de PSA-NCAM par les neurones entériques .....	68
IV.	DISCUSSION .....	72
V.	CONCLUSION .....	82
	REMERCIEMENTS .....	85
	RÉFÉRENCES .....	86

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

### **II. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

**Tableau I. Critères utilisés pour évaluer les dommages macroscopiques suite à l'induction de colites avec l'injection de TNBS dans le côlon chez le rat ..... 43**

**Tableau II. Critères utilisés pour l'évaluation histologique de la sévérité des colites induites par l'injection de TNBS dans le côlon chez le rat ..... 43**

**Tableau III. Anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence ... 46**

**Tableau IV. Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence .. 46**

## **LISTE DES FIGURES**

---

### **I. INTRODUCTION**

**Figure 1. Organisation générale de la paroi de l'intestin ..... 5**

**Figure 2. Centres de contrôle des fonctions digestives ..... 8**

**Figure 3. Arc réflexe court du système nerveux entérique ..... 10**

**Figure 4. Colonisation du tube digestif par les précurseurs issus des  
différents segments des crêtes neurales ..... 13**

**Figure 5. Structure de NCAM et les différents isoformes produits par  
épissage alternatif ..... 21**

**Figure 6. L'attachement de l'acide polysialique (PSA) à NCAM via les  
polysialyltransférases STX et PST ..... 23**

**Figure 7. Effet de l'ajout de PSA sur les interactions homophiliques de  
NCAM ..... 26**

**Figure 8. Le signalement Ret-indépendant de GDNF et GFR $\alpha$ 1 peut se  
faire via NCAM ..... 28**

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Figure 9. Montage des tissus frais pour la fixation ..... 40**

## III. RÉSULTATS

**Figure 10. L'expression de PSA-NCAM dans l'intestin augmente au cours du développement de l'embryon ..... 53**

**Figure 11. Expression de PSA-NCAM sur les neurones du SNE varie au cours du développement ..... 54**

**Figure 12. Le muscle lisse exprime transitoirement PSA-NCAM chez l'embryon ..... 55**

**Figure 13. À P1, PSA-NCAM est localisé sur la membrane cytoplasmique des neurones ainsi que sur les extensions neuritiques ..... 58**

**Figure 14. L'expression de PSA-NCAM commence à diminuer après la naissance ..... 59**

**Figure 15. L'expression de PSA-NCAM diminue rapidement après le sevrage ..... 60**

**Figure 16. NCAM est exprimé par les neurones, le mésenchyme et le muscle lisse chez l'embryon ..... 62**

**Figure 17. Aux stades postnataux, NCAM continue d'être exprimé par les neurones et les cellules gliales dans les deux plexus entériques ..... 63**

- Figure 18. L'injection de TNBS cause la destruction de la muqueuse et engendre une forte réaction inflammatoire ..... 66**
- Figure 19. Examen macroscopique de la sévérité des colites ..... 67**
- Figure 20. L'inflammation induite avec l'injection de TNBS cause une réexpression de PSA-NCAM à la surface des neurones myentériques 3 jours après l'induction des colites ..... 69**



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

°C	degré Celsius
ART	artemin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CAM	molécule d'adhésion cellulaire
CGE	cellule entérique gliale
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
Da	Dalton
DAG	diacylglycerol
E	embryon
Endo-N	enzyme endoneuraminidase
FGFr	fibroblast growth factor receptor
g	gramme
GDNF	glial-cell-line-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Ig	immunoglobuline
l	litre
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
m	mètre

M	molaire
ManBut	N-butanoyl-mannosamine
ManProp	N-pentanoyl-mannosamine
NaIO4	sodium métapériodate saturé
NCAM	neural cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NT-3, 4/5	neurotrophine 3 et neurotrophine 4 et 5
NTN	neurturin
P	Post-natal
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyéthylèneglycol
PGP9.5	protein gene product 9.5
PSA	acide polysialylique
PSA-NCAM	forme polysialylée de NCAM
PSP	persephin
RMS	rostral migratory stream
SNC	système nerveux central
SNE	système nerveux entérique
SNP	système nerveux périphérique
SVZ	zone subventriculaire

# **I. INTRODUCTION**

## I. INTRODUCTION

---

Le système nerveux entérique (SNE) est présent dans la paroi du tube digestif et constitue la division la plus complexe du système nerveux périphérique. Le SNE est le résultat de la migration, au cours du développement embryonnaire, de précurseurs neuro-gliaux issus des crêtes neurales. Les plexus entériques matures forment un réseau de plusieurs millions de ganglions interconnectés et les neurones et cellules gliales qui les composent sont compactés à l'intérieur de ceux-ci. L'organisation neuronale ressemble beaucoup à celle du système nerveux central. Les phénomènes d'adhésion intercellulaire à l'intérieur de ces ganglions ont une importance majeure tant au cours du développement (migration, établissement des structures synaptiques adultes) que dans le SNE mature. En effet, les plexus entériques subissent des stress mécaniques permanents, secondaires à l'activité mécanique des muscles qui les entourent. Quand l'intestin est relaxé, les neurones à l'intérieur des ganglions sont étendus et forment une monocouche cellulaire, tandis que lorsque l'intestin est contracté, les neurones changent de forme, d'orientation et se superposent.<sup>85</sup> Les mécanismes d'adhésion entre les neurones entériques et les cellules gliales sont ainsi grandement sollicités.<sup>85</sup> Une grande variété de molécules de surface a déjà été identifiée dans le système nerveux, les mieux caractérisées étant les molécules d'adhésion des cellules neuronales (NCAM). Ces dernières permettent principalement le regroupement cellulaire et fournissent une certaine stabilité en établissant un ancrage physique des cellules à leur environnement.<sup>65</sup> Les NCAM sont sujettes à des modifications post-transcriptionnelles dont, entre autre, l'ajout d'acide polysialique (PSA). La molécule qui en résulte, PSA-NCAM, joue un rôle majeur durant le développement du système nerveux central et au cours des phénomènes de plasticité neuronale dans le cerveau adulte.<sup>104</sup>

Aucune étude n'a toutefois eu pour objet de décrire avec précision son expression et son rôle dans le système nerveux entérique embryonnaire et post-natal. Avant d'entrer dans le vif du sujet, voici tout d'abord une revue de la littérature portant, en premier lieu sur le système nerveux entérique et son développement, puis en second lieu sur NCAM et PSA-NCAM.

## 1. LE SYSTÈME NERVEUX ENTÉRIQUE

Sous des conditions normales, dans le système digestif, les aliments sont ingérés, mâchés, puis digérés en des molécules simples, après leur mélange avec les sucs gastriques, pancréatiques et biliaires. Les nutriments sont ensuite absorbés et transférés, à travers les cellules de la muqueuse, jusque dans la circulation sanguine. Ce qui n'est pas absorbé continue son chemin le long des intestins jusqu'à l'anus pour leur excrétion.<sup>116</sup> Ce processus se déroule d'une façon ordonnée et dépend des capacités intrinsèques du tractus gastro-intestinal à générer les mouvements mécaniques nécessaires.

WM Bayliss et EH Starling ont observé, en isolant un fragment d'intestin de chien, les mouvements qui permettent au contenu d'avancer dans le tube digestif et ils ont nommé ce mouvement « la loi de l'intestin ». <sup>18,55</sup> Ceci a permis de mettre en évidence ces mouvements qui sont maintenant connus sous le nom de péristaltisme. <sup>55</sup> La découverte de neurones dans la paroi de l'intestin par L Auerbach et G Meissner, environ cinquante ans avant celle de Bayliss et Starling, a permis de définir le système nerveux entérique comme étant l'ensemble des neurones et cellules de support présents dans la paroi du tractus gastro-intestinal, de l'œsophage jusqu'à l'anus, ainsi que dans les glandes associées (glandes salivaires, pancréas et vésicule biliaire). <sup>55,91</sup>

Le système nerveux entérique fait partie intégrante du système nerveux périphérique (SNP), dont il est la plus grande division, mais plusieurs particularités font de lui un système distinct assez ressemblant au système nerveux central (SNC). La plus grande distinction du système nerveux entérique, par rapport au SNP, est qu'il ne requiert pas obligatoirement l'intervention du SNC pour fonctionner adéquatement. <sup>100</sup> De plus, le SNE compte près de 100 millions de neurones, soit approximativement le même nombre de neurones présents dans la moelle épinière, et il est constitué d'une grande diversité de phénotypes neuronaux distribués le long du tractus gastro-intestinal. <sup>55, 67, 101</sup> À l'intérieur des ganglions entériques, on peut retrouver un mélange hétérogène des différentes classes de cellules nerveuses. <sup>29</sup> À ce jour, dix-sept types de neurones intrinsèques ont été répertoriés et chaque type

possède une combinaison caractéristique de propriétés morphologiques, neurochimiques et biophysiques.<sup>42</sup> Toutes les classes de neurotransmetteurs retrouvés dans le SNC, incluant l'acétylcholine, la sérotonine, la dopamine ainsi que l'oxyde nitrique, sont présentes dans les neurones entériques, et plus de trente neurotransmetteurs ont déjà été identifiés.<sup>45, 50, 73, 91, 117</sup> Les neurones expriment habituellement des combinaisons différentes de ceux-ci et ce code chimique varie selon le type de neurone et sa fonction.<sup>29, 63, 55</sup> L'oxyde nitrique est un important neurotransmetteur des neurones du SNE et les neurones nitrergiques représentent environ de 20 à 30% de l'ensemble des neurones entériques.<sup>23</sup>

## 1.1 Structure du SNE

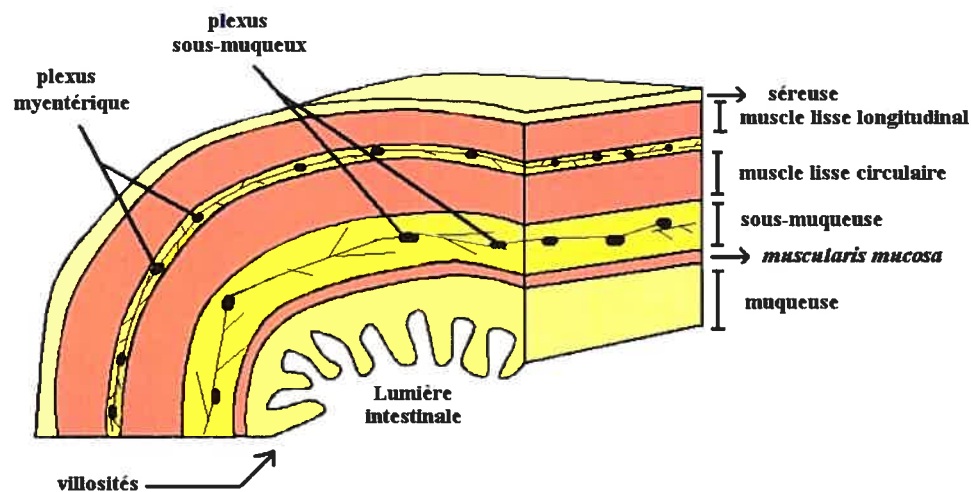
Les différents segments de l'intestin accomplissent des tâches différentes et ceci implique du même coup qu'ils ont une morphologie distincte. De ce fait, la morphologie des plexus varie graduellement du duodénum au rectum.<sup>113</sup> Il y a également des différences dans l'organisation neuronale, le nombre ainsi que dans la proportions des différents types de neurones.<sup>38</sup>

Les plexus entériques sont exclusivement constitués de neurones et de cellules spécialisées dans le support des éléments neuronaux, les cellules gliales entériques.<sup>61</sup> Les plexus sont dépourvus de tissus conjonctif et de vaisseaux sanguins et ils sont aussi caractérisés par un très faible espace extracellulaire ainsi que par l'absence de fibre de collagène.

Dans la paroi du tube digestif, les neurones entériques et les cellules gliales s'assemblent en ganglions qui sont disposés en anneaux concentriques et ceux-ci forment des plexus qui se trouvent à deux niveaux, le plexus myentérique (d'Auerbach) et le plexus sous-muqueux (de Meissner) (figure 1).  
41, 50, 55, 94, 122

Le plexus myentérique est situé entre une couche musculaire lisse longitudinale externe et une couche musculaire lisse circulaire interne.<sup>67</sup> Les neurones du plexus myentérique sont présents dans la paroi du tube digestif, de l'œsophage jusqu'au rectum et forment le principal réseau nerveux du tractus

gastro-intestinal.<sup>50, 55</sup> Dans le plexus myentérique des mammifères, en plus des neurones et des cellules gliales, se trouvent les cellules interstitielles de Cajal. Elles forment un réseau dense autour des neurones et ont pour fonction d'agir comme « pacemaker » afin de mieux coordonner la motilité intestinale.<sup>18, 41</sup> Le plexus sous-muqueux, quant à lui, est situé dans la couche sous-muqueuse et il est plus développé dans l'intestin grêle plus qu'à tout autre endroit dans le tube digestif.<sup>50, 55</sup>



**Figure 1.** Organisation générale de la paroi de l'intestin (D'après Cabarrocas J, 2003)

Le support structural et la protection des neurones ne se fait pas par les cellules de Schwann, comme dans le reste du SNP, mais se fait par une population de cellules uniques au SNE, qui ressemblent aux astrocytes du système nerveux central, les cellules gliales entériques (CGE).<sup>23</sup> En fait, celles-ci représentent morphologiquement et fonctionnellement l'équivalent des astrocytes dans le SNC.

Les CGE surpassent en nombre les neurones entériques dans une proportion d'environ deux pour un.<sup>67</sup> Elles enveloppent les corps cellulaires des neurones contenus dans chaque ganglion ainsi que les extensions neuronales inter-ganglionnaires. Une cellule gliale peut envelopper plusieurs neurones à la fois, contrairement aux cellules de Schwann qui enrobent individuellement chaque neurone.<sup>48, 61</sup> En plus de la protection structurale que confère les CGE aux neurones, ces dernières les protègent via la sécrétion de

facteurs neurotrophiques tel que GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor), tant dans l'intestin foetal que mature.<sup>12</sup> Elles ont des fonctions trophiques et de protection envers les neurones entériques et sont impliquées dans la modulation des activités neuronales.<sup>23</sup> Les CGE sont aussi des éléments actifs du SNE durant la réponse inflammatoire et immunitaire partageant avec les astrocytes la possibilité d'agir en tant que cellule présentatrice d'antigène et réagissant à différentes cytokines.<sup>58, 107</sup> Ces cellules gliales ont aussi la capacité de maintenir l'intégrité du tissu et interviennent dans la perméabilité du tractus gastro-intestinal.<sup>23</sup>

Les CGE sont riches en granules de glycogène et elles sont les seules cellules du SNE à exprimer le substrat requis pour la synthèse de l'oxyde nitrique, L-arginine.<sup>9, 24</sup> Les CGE ne produisent pas de myéline, mais possèdent des filaments intermédiaires riches en GFAP (glial fibrillary acidic protein) et en protéine S100, ce qui les distinguent des cellules de Schwann, mais qui les rapprochent des astrocytes.<sup>23</sup> Puisqu'elles expriment les protéines GFAP et S100, ces dernières servent couramment de marqueur pour identifier les cellules gliales.

## 1.2 Fonctions du SNE

L'idée que le système digestif soit muni d'un « deuxième cerveau » est apparue au début du XX<sup>ème</sup> siècle lorsque des recherches ont démontré que le péristaltisme résultait de l'action d'arcs réflexes indépendants du SNC.<sup>50</sup> Les neurones entériques sont en effet capables de générer des mouvements propulsifs coordonnés des muscles et ce, même en l'absence d'innervation extrinsèque.<sup>42, 116</sup> Le SNE est donc considéré comme étant la deuxième structure nerveuse la plus complexe, après le système nerveux central. Le nombre de neurones entériques ainsi que leur complexité reflètent la capacité du SNE à pouvoir générer des réflexes de façon autonome.<sup>61, 62</sup>

Le SNE n'est pas essentiel durant la vie embryonnaire, mais le devient dès la naissance.<sup>90</sup> Il contrôle la motilité gastro-intestinale, les sécrétions endocrines et exocrines, la micro-circulation sanguine du tube digestif et il est aussi impliqué dans les processus immunitaires et inflammatoires.<sup>50, 90, 100</sup> De



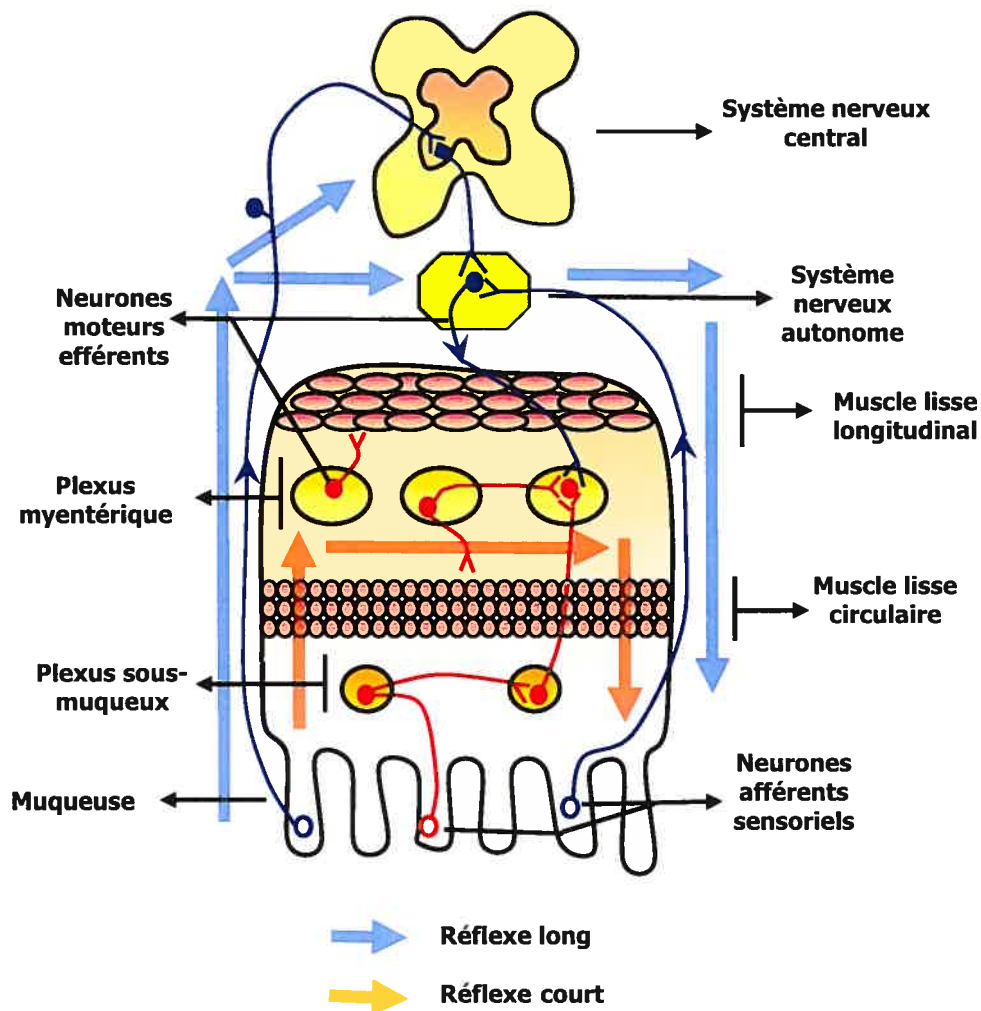
plus, le SNE joue un rôle important dans la perception sensorielle de stimuli. En effet, des récepteurs sensoriels sont disséminés dans la paroi du tube digestif en entier afin d'apporter constamment de l'information au système nerveux central. Diverses classes de récepteurs sont impliquées dans la détection de changements mécaniques, chimiques, thermiques, et nociceptifs <sup>77, 100, 132</sup> Les mécanorécepteurs envoient de l'information sur la distension de la paroi du tube digestif et les mouvements du bol alimentaire. Les chimiorécepteurs, quant à eux, informent les centres nerveux sur les concentrations des différents nutriments, l'osmolarité et le pH du bol alimentaire. <sup>132</sup> Les thermorécepteurs répondent aux changements de température et les nocicepteurs réagissent aux stimuli potentiellement nuisibles pour l'organisme et l'information qu'ils transmettent est perçue comme de la douleur par le cerveau. <sup>78</sup>

Le plexus myentérique innerve principalement les deux couches musculaires qui l'entourent et ces neurones régissent la motilité de la paroi du tube digestif en régulant la segmentation et le péristaltisme. <sup>50, 78</sup> Afin de permettre un meilleur contrôle de la contractilité des muscles de la paroi, les neurones peuvent être inhibiteurs ou excitateurs des cellules musculaires qu'ils innervent, causant la relaxation ou la contraction des cellules musculaires. <sup>53</sup> Lorsque celles-ci sont stimulées, les principaux effets sont l'augmentation du tonus de la paroi et l'augmentation de l'intensité et du rythme des contractions, causant une augmentation du péristaltisme. <sup>53</sup> Les principaux neurotransmetteurs des neurones moteurs excitateurs sont l'acétylcholine et la substance P. <sup>52, 55</sup> Les neurones moteurs inhibiteurs relâchent majoritairement, pour leur part, le peptide intestinal vasoactif et l'oxyde nitrique. <sup>52, 55</sup>

Le plexus sous-muqueux, quant à lui, innerve les cellules endocrines intestinales, la *muscularis mucosa* ainsi que les vaisseaux sanguins sous-muqueux. <sup>50, 55</sup> Ainsi donc, le plexus de Meissner joue un rôle important dans le contrôle des sécrétions de la paroi et dans l'absorption des nutriments et de l'eau et il n'est donc pas surprenant qu'il soit plus développé dans l'intestin et pratiquement absent dans l'œsophage et dans l'estomac. <sup>50, 53, 94</sup>

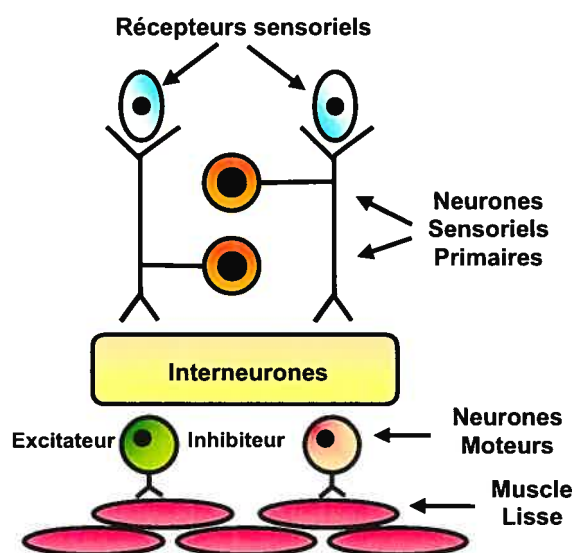
### 1.3 Arcs réflexes du SNE

La motilité et les sécrétions intestinales sont régies à la fois par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Elles sont donc sous la dépendance de deux arcs réflexes : un court, qui dépend entièrement de l'activité des plexus nerveux entériques et un long, qui fait intervenir les centres du SNC et ceux du système nerveux autonome sympathique et parasympathique (figure 2).<sup>78, 116</sup>



**Figure 2.** Centres de contrôle des fonctions digestives (D'après Berner Hansen M, 2003)

Contrairement aux ganglions du reste du système nerveux autonome, qui servent plutôt de centre de distribution de l'information vers le système nerveux central, les ganglions entériques sont interconnectés afin de former un réseau nerveux qui intègre et traite l'information, un peu comme le sont les ganglions nerveux présents dans le SNC et la moelle épinière.<sup>132</sup> L'arc réflexe court par lequel le SNE peut moduler de façon autonome une réponse aux stimuli locaux se compose de trois types de neurones distincts: 1° les neurones afférents (ou sensoriels), 2° les interneurones et 3° les neurones efférents (ou moteurs) (figure 3) et la proportion de ces trois types de neurones est de 2:1:1.<sup>55, 72, 90</sup> Les neurones afférents sont présents dans les deux plexus entériques et reçoivent l'information sensorielle provenant de l'ensemble du système digestif. Ils sont spécialisés dans la détection de changements thermiques, chimiques, mécaniques et nociceptifs<sup>77, 100, 132</sup> Les neurones afférents transforment les stimuli en signaux codés par des potentiels d'action qui sont alors transmis aux interneurones le long de fibres nerveuses sensorielles. Ces derniers intègrent et gèrent l'information sensorielle reçue et dictent le comportement que doivent adopter les neurones moteurs et sécrétomoteurs.<sup>132</sup> Ils forment le dernier relais de l'information vers les divers effecteurs du système digestif qui sont : les cellules musculaires, l'épithélium de la muqueuse, le réseau vasculaire et les glandes de la paroi du tube digestif. Les neurones moteurs contrôlent la contraction ou la relaxation des cellules musculaires et les neurones sécrétomoteurs et vasomoteurs contrôlent, quant à eux, les sécrétions et l'irrigation sanguine du tube digestif, la plupart de leurs corps cellulaires étant disposés dans la tunique muqueuse et sous-muqueuse.<sup>55</sup>



**Figure 3.** Arc réflexe court du système nerveux entérique

L'ensemble de ces trois types de neurones constitue l'arc réflexe court par lequel le SNE peut fonctionner indépendamment de toute innervation extrinsèque.<sup>90</sup> Bien que celui-ci puisse fonctionner de façon autonome, le SNC et le SNP peuvent tout de même l'influencer, via un arc réflexe long (figure 2). Le SNE reçoit une innervation extrinsèque des deux divisions du système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) qui agissent principalement afin de modifier les circuits pré-programmés au niveau des deux plexus entériques.<sup>53, 130</sup>

L'action du système parasympathique, via le nerf vague, permet de contrôler certaines parties du tube digestif proximal et distal, soit l'œsophage, l'estomac, le pancréas, le gros intestin et spécialement les régions anales et rectales, qui sont pour leur part impliquées dans le réflexe de défécation.<sup>29, 53, 116, 132</sup> Les nerfs parasympathiques originent dans le tronc cérébral et dans la moelle épinière et voyagent via les nerfs vagues et innervent les neurones du SNE.<sup>130</sup> L'activation de ces neurones cholinergiques entraîne une action positive sur le système digestif qui accélère alors le péristaltisme et en accroît les sécrétions.<sup>78</sup> Ce système envoie également de l'information au SNC concernant la distension du tube ou la concentration de différentes substances contenues dans la lumière de ce dernier (glucose, acides aminés, acides gras),

afin d'informer les centres intégratifs supérieurs sur les sensations physiologiques non douloureuses et maintenir l'homéostasie.<sup>53, 55, 132</sup>

Les fibres du système sympathique sont quant à elles adrénergiques et ont plutôt une action contraire à celle du système parasympathique. Elles inhibent donc le péristaltisme, soit en inhibant directement les cellules musculaires, soit en inhibant les neurones entériques.<sup>50, 53</sup> Les nerfs sympathiques prennent leur origine dans la moelle épinière et font synapse dans le ganglion pré-vertébral, qui envoie alors des fibres nerveuses vers le SNE et les vaisseaux sanguins du tractus gastro-intestinal.<sup>130</sup> Il est à noter que la majorité (80%) des fibres extrinsèques qui innervent l'intestin sont des nerfs afférents primaires (qui vont du système digestif vers le SNC), contre seulement 20% qui sont efférents (du SNC et SNP vers les neurones entériques).<sup>53, 61, 118</sup>

#### 1.4 Développement du SNE

Le système digestif est le premier système à polariser l'embryon en formant une entrée et une sortie. Le patron de développement du SNE et la topographie des neurones entériques semble assez bien conservé parmi les poissons, amphibiens, oiseaux et mammifères et il a fort probablement été hérité d'un ancêtre commun et peu modifié depuis plus de 300 millions d'années.<sup>52, 90</sup>

Le développement de l'embryon débute par la formation de trois feuillets embryonnaires primitifs : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. L'ectoderme, une couche externe neuronale et protectrice, forme, entre autre, l'épiderme ainsi que l'ensemble du tissu nerveux.<sup>78</sup> L'endoderme, une couche interne nutritive, forme pour sa part la muqueuse et l'épithélium du tube digestif ainsi que la majorité de ses structures annexes (foie, pancréas).<sup>129</sup> Enfin, le mésoderme, une couche intermédiaire, forme les os, les muscles ainsi que l'ensemble du système vasculaire et lymphatique.<sup>129</sup> L'intestin est formé de l'association de l'endoderme avec le mésoderme tôt durant le développement embryonnaire. Cette interaction permet la formation de

l'intestin primitif en couches concentriques de type cellulaire différent.<sup>41</sup> L'endoderme donne naissance à la muqueuse qui couvre entièrement la lumière de l'intestin et le mésoderme, quant à lui, se différencie en couche musculaire circulaire et longitudinale ainsi qu'en sous-muqueuse.<sup>41</sup>

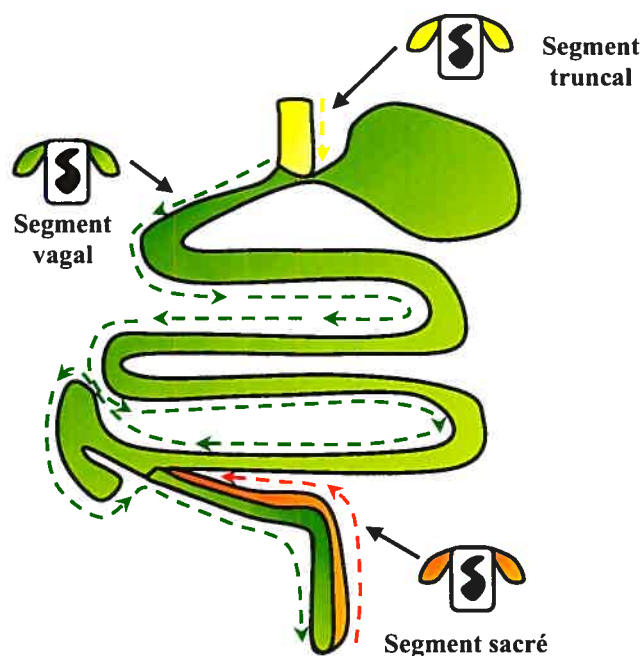
#### 1.4.1 Les crêtes neurales

Peu de temps après la conception, chez les mammifères, l'ectoderme s'épaissit pour former la plaque neurale puis, celle-ci s'invagine pour former un sillon que deux plis neuronaux bordent.<sup>78</sup> À mesure que le sillon s'approfondit, les plis se rapprochent jusqu'à se fusionner. Le tube neural est alors formé et il se détache de l'ectoderme et commence à se différencier en moelle épinière et en encéphale.<sup>78</sup> Quelques cellules des plis neuronaux se détachent durant ce processus et migrent de chaque côté du tube pour former les crêtes neurales d'où prendront naissance les neurones du système nerveux périphérique ainsi que les neurones du système nerveux entérique.<sup>78, 100, 122</sup> Les cellules des crêtes neurales migrent le long de courant migratoires bien définis, forment des agrégations locales et infiltrent différents tissus.<sup>129</sup> Ces cellules ont des propriétés migratrices très développées et possèdent la capacité de générer une panoplie de phénotypes cellulaires différents, tels que les neurones, les cellules gliales, les mélanocytes, les cellules endocrines, du tissu conjonctif, des os et du cartilage.<sup>100</sup> Au cours de leur migration, les cellules issues des crêtes neurales se divisent afin de produire une quantité suffisante de cellules multipotentes pour coloniser le tube digestif en entier.<sup>60</sup>

#### 1.4.2 Colonisation du SNE

Les neurones entériques et les cellules gliales dérivent tous deux de cellules précurseurs dérivées des crêtes neurales et originent dans le segment vagal (somites 1 à 7), la partie proximale du segment truncal (somites 8 à 28) ainsi que dans le segment sacré (somites postérieurs à 28) du névraxe embryonnaire (figure 4).<sup>100, 101, 122</sup> La principale source de neuroblastes entériques origine dans les crêtes neurales qui se situent au niveau des somites

1 à 7, et celles-ci colonisent presque entièrement le tube digestif.<sup>70</sup> Les cellules du segment vagal migrent progressivement vers le tube digestif et y pénètrent à la hauteur de l'œsophage et les cellules multipotentes colonisent en entier le tube en direction rostro-caudale.<sup>135, 139</sup> Les cellules provenant des crêtes neurales sacrées colonisent principalement la portion post-ombilicale du tube digestif, soit le côlon et le rectum, et ce, dans une direction caudo-rostrale sans toutefois dépasser l'intestin grêle.<sup>50, 70</sup> Ces cellules colonisent la partie distale du tractus gastro-intestinal avant que les cellules issues des crêtes vagues n'arrivent à cet endroit.<sup>45</sup> Dans cette région, les ganglions des plexus myentérique et sous-muqueux ont donc une double origine, vagale et sacrée. Une troisième région des crêtes neurales, la partie truncale, participe aussi à la colonisation du tube digestif en s'infiltrant dans l'œsophage et en colonisant uniquement ce dernier dans une direction rostro-caudale.<sup>46</sup>



**Figure 4.** Colonisation du tube digestif par les précurseurs issus des différents segments des crêtes neurales (D'après Gershon MD, 1997).

Arrivées dans le tube digestif, les cellules indifférenciées se frayent un chemin à travers le mésenchyme, les futures cellules musculaires.<sup>135</sup> Le mésenchyme de l'intestin embryonnaire du rat exprime différentes molécules

diffusibles qui influencent la migration des progéniteurs du SNE, tel que le facteur neurotrophique GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor).<sup>88, 110, 138</sup> Ce dernier promeut la migration des progéniteurs du SNE avant leur entrée dans l'intestin proximal, en attirant les cellules pré-entériques qui expriment le récepteur tyrosine kinase Ret dans l'intestin.<sup>88, 138</sup> L'expression de ce chemoattractant par les cellules mésenchymateuses permet d'éviter que les cellules issues des crêtes neurales ne restent dans le mésentère ou les tissus environnants.<sup>138</sup> Une fois que les précurseurs des neurones entériques sont en place dans le plexus myentérique, une partie de ceux-ci effectue une deuxième migration en direction du plexus sous-muqueux et ce, avant que les couches musculaires longitudinales et circulaires ne se forment et freinent le mouvement des neurones.<sup>82, 135</sup> Cette migration s'effectue vers dix-huit jours de gestation chez le fœtus de la souris.<sup>82</sup>

Le pancréas, tout comme la vésicule biliaire, se développe à partir d'un bourgeon du tube digestif proximal chez le fœtus et il existe donc des projections nerveuses qui connectent les neurones du plexus myentérique de l'estomac et du duodénum avec ceux du pancréas et de la vésicule biliaire.<sup>46, 61</sup>

#### 1.4.3 Différenciation des cellules issues des crêtes neurales

Les cellules dérivées des crêtes neurales colonisent l'intestin embryonnaire dans une vague rostro-caudale et se différencient en neurones ou en cellules gliales entériques dans cette même direction.<sup>137</sup> Puisque le système digestif est relativement long à coloniser, il n'est pas surprenant de voir que les cellules en position proximale peuvent être à des stades de différenciation avancés tandis que les cellules en position caudales demeurent encore indifférenciées.<sup>135</sup> Le phénotype que prendront des cellules dérivées des crêtes neurales dépend des signaux environnementaux que les cellules recevront lorsqu'elles seront arrivées à leurs destinations finales.<sup>100, 136, 139</sup> Lorsqu'elles sont en train de migrer, les cellules issues des crêtes neurales n'expriment aucun phénotype neuronal ou glial et elles sont donc considérées comme étant indifférenciées. Elles expriment alors certains marqueurs distinctifs tels que p75, Phox2b, un facteur de transcription requis pour l'expression de Ret, et le



récepteur tyrosine kinase Ret.<sup>62, 137</sup> Peu de temps après avoir cessé de migrer, les cellules commencent à se différencier soit vers la lignée neuronale, soit vers la lignée des cellules gliales. Les cellules qui deviendront des neurones continuent d'exprimer Phox2b et Ret, mais diminuent leur expression de p75 et commencent à exprimer Phox2a.<sup>137</sup> Les cellules qui deviendront des cellules gliales, quant à elles, continuent d'exprimer p75, mais diminuent leur expression de Ret.<sup>137</sup>

#### 1.4.4 Les facteurs neurotrophiques

Le guidage adéquat des cellules issues des crêtes neurales est essentiel pour le développement d'un SNE fonctionnel. Un patron normal de projections axonales est crucial pour que l'activité péristaltique de l'intestin se déroule correctement. Pour cela, il faut qu'il y ait une coordination temporelle et spatiale du développement entre le mésenchyme et les cellules issues des crêtes neurales.<sup>41</sup> Des contacts stables entre les neurones et leurs cibles sont très importants pour le bon fonctionnement du système nerveux entérique. La régulation de ces contacts se fait par l'action de facteurs trophiques localement ou sur de longues distances. Les facteurs neurotrophiques sont essentiels pour le développement et le maintien du système nerveux entérique en stimulant la différenciation neuronale, en promouvant la survie des neurones ainsi qu'en modulant la plasticité postnatale.<sup>23, 88, 110</sup> Chez les mammifères, quoiqu'ils aient une importante fonction au cours du développement, les facteurs neurotrophiques sont également présents durant la vie adulte. C'est le cas de BDNF, NT-3 et GDNF, qui sont localisés principalement dans les cellules des ganglions entériques adultes.<sup>74, 95</sup>

#### 1.4.5 Facteurs neurotrophiques de la famille GDNF

Ce petit groupe de facteurs neurotrophiques représente une classe importante de médiateurs solubles de la survie neuronale, de la croissance neuritique et de la différenciation.<sup>93</sup> GDNF (glial-cell-line-derived

neurotrophic factor), neurturin (NTN), persephin (PSP) et artemin (ART) font partie de cette famille.<sup>93</sup>

Le facteur de croissance GDNF est connu pour favoriser la survie des neurones dopaminergiques du cerveau en plus de favoriser la survie et de réguler la différenciation de plusieurs types de neurones périphériques tels que les neurones sympathiques, parasympathiques, sensoriels et entériques.<sup>111, 137</sup> NTN, pour sa part, est important pour la survie des neurones entériques post-mitotiques.<sup>105</sup> Avec GFR $\alpha$ 1, un membre de la famille des cellules de surface liées par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), le récepteur tyrosine kinase Ret forme le récepteur pour GDNF.<sup>123</sup> NTN, qui possède 40% d'identité avec GDNF, peut aussi activer Ret, mais via GFR $\alpha$ 2.<sup>62, 123</sup> Le récepteur tyrosine kinase Ret et GFR $\alpha$ 1 sont exprimés dans toutes les portions du SNE embryonnaire, de l'estomac jusqu'au rectum.<sup>110</sup> La signalisation Ret est nécessaire pour l'invasion initiale ainsi que la migration rostro-caudale subséquente des précurseurs du SNE dans l'intestin des embryons.<sup>88, 138</sup> L'activation de Ret par les cellules qui l'exprime permet la survie cellulaire et la différenciation via la voie MAP kinase et de la voie PI(3) kinase.<sup>88, 123</sup> Avant leur entrée dans l'intestin proximal, pendant la phase préliminaire du développement du SNE, les futures cellules entériques dérivées des crêtes neurales expriment Ret et sont donc sensibles à GDNF et à NTN.<sup>123</sup> Cette expression diminue aux stades plus tardifs de l'histogénèse du SNE et les précurseurs neuronaux deviennent alors plus sensibles à d'autres facteurs neurotrophiques, tel que NT-3, qui promeut la différenciation cellulaire, plutôt que la migration.<sup>123</sup>

Ret joue un rôle si important dans la colonisation du système nerveux entérique qu'une mutation de ce gène cause la perte totale de SNE.<sup>110, 135, 137, 139</sup> Chez l'humain, cette mutation cause la maladie de Hirschsprung, une maladie infantile qui se manifeste par la présence de zones hypo ou aganglionnaires dans des segments plus ou moins longs du tube digestif.<sup>47, 123</sup> Dans ces segments dépourvus de neurone entérique, l'onde péristaltique ne peut être propagée et le bol alimentaire ne peut être évacué.<sup>90</sup> Ceci provoque un élargissement de la région en amont du segment dépourvu de neurone et il en résulte un mégacôlon.<sup>90</sup>

#### 1.4.6 Facteurs neurotrophiques de la famille des neurotrophines

Les neurotrophines (NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophine-3) et NT-4/5 (neurotrophine-4/5)) sont des facteurs de croissance largement retrouvés chez les Vertébrés.<sup>73</sup> Tous les membres sont synthétisés sous forme de précurseurs qui, une fois clivés, donnent les neurotrophines matures.<sup>57</sup> Aux stades plus tardifs du développement, ces facteurs de croissance sont nécessaires afin d'assurer la survie cellulaire en promouvant l'expression des caractéristiques neuronales.<sup>26</sup> NT-3 a aussi un rôle à jouer dans l'entretien du SNE, puisqu'en plus d'inciter les cellules issues des crêtes neurales à se développer en neurones, NT-3 augmente la croissance des neurites dans les neurones myentériques postnataux.<sup>26</sup> Les neurotrophines se lient avec basse ou haute affinité à des récepteurs membranaires. Le récepteur P75 est une glycoprotéine qui lie avec une faible affinité les neurotrophines et qui est impliquée tant dans les mécanismes de survie que de mort cellulaire.<sup>37, 73, 137</sup> Les récepteurs tyrosine kinase Trk sont des récepteurs de hautes affinités des neurotrophines. TrkA, TrkB et TrkC lient respectivement NGF, BDNF et NT-4/5, et NT-3.<sup>71</sup> Les protéines Trk et leurs ARNm ont été observés dans les neurones du SNC, du SNP et du SNE.<sup>73, 74</sup> TrkA (et NGF), TrkC (et NT-3) et p75 sont exprimés sur les neurones des plexus myentérique et sous-muqueux tant au cours du développement de l'embryon que chez l'adulte.<sup>37</sup> TrkA et TrkC sont responsables de la promotion de la croissance neuronale des neurones entériques durant le développement en plus de réguler la synthèse de divers neuropeptides par les neurones entériques.<sup>37</sup> TrkB et p75 sont exprimés uniquement sur les cellules gliales et l'absence de TrkA et TrkC dans ces cellules suggère que celles-ci ne peuvent répondre à NGF et/ou à NT-3.<sup>37</sup> Toutefois, il a été démontré que NT-3 pouvait augmenter la proportion de cellules gliales dans le SNE en développement.<sup>25</sup> Cette réponse est donc probablement induite via le récepteur à faible affinité p75, qui lui, est présent dans les cellules gliales.

## 1.5 Plasticité post-natale du SNE

Plusieurs études ont démontré que le développement du SNE n'est pas complété à la naissance et que les neurones entériques ne sont pas encore différenciés complètement. Il est vrai que le tractus gastro-intestinal doit s'adapter continuellement aux changements de longueurs de l'intestin et c'est pourquoi il demeure encore flexible chez le nouveau-né. Au moment de la naissance, les neurones entériques peuvent être visualisés sous forme de bandes continues qui se fragmentent subséquemment pour former les ganglions entériques.<sup>38, 113</sup> Il a été observé, chez les jeunes animaux, que le plexus myentérique forme un réseau plus dense et plus compacte et que ce dernier se distend avec l'âge.<sup>44, 113</sup> De plus, on a aussi dénoté une augmentation du volume des neurones au cours du développement postnatal, augmentation qui peut facilement être expliquée par un accroissement de l'épaisseur de la musculature lisse qui doit être innervée.<sup>112, 113</sup> L'étude de l'apparition de trois neurotransmetteurs présents dans les neurones entériques matures durant le développement du SNE, soit l'oxyde nitrique, le peptide vasoactif intestinal (VIP) ainsi que PACAP-27 (pituitary adenylyl-cyclase-activating peptide), a permis de démontrer, grâce à leur apparition progressive durant le sevrage, que les neurones entériques n'acquièrent un phénotype neurochimique mature qu'un mois après la naissance chez le rat.<sup>80</sup> Les cellules interstitielles de Cajal demeurent elles aussi indifférenciées au moment de la naissance et n'acquièrent leur morphologie adulte que durant l'allaitement des nouveaux-nés.<sup>38</sup>

## 1.6 Conséquences de l'inflammation sur le SNE

Le système digestif est constamment exposé à divers antigènes, bactéries, virus et toxines provenant de l'extérieur de l'organisme.<sup>132</sup> Les barrières chimiques et physiques sont souvent insuffisantes pour exclure complètement les charges antigéniques de sorte que le système immunitaire entérique est souvent sollicité ce qui contribue à l'établissement d'un état physiologique basal d'inflammation.<sup>118, 131</sup> De ce fait, les neurones entériques

possèdent plusieurs caractéristiques uniques qui leurs confèrent une grande capacité d'adaptation et ils sont donc considérés comme ayant un haut degré de plasticité.<sup>119</sup> Lorsqu'un agent pathologique est détecté par les mastocytes du système immunitaire entérique, ceux-ci signalent sa présence en sécrétant divers médiateurs qui attirent les cellules immunitaires et inflammatoires de la circulation sanguine vers le foyer pathologique.<sup>131</sup> Le relâchement des diverses substances (histamine, 5-hydroxytryptamine et différentes cytokines) lors de la dégranulation des mastocytes provoque plusieurs réponses locales dont, entre autre, l'activation des neurones entériques ainsi que l'empêchement de leur inhibition par le système nerveux sympathique, soit par le blocage de la sécrétion de norépinéphrine, soit par l'inhibition des récepteurs des fibres noradrénergiques.<sup>40, 92, 121, 133</sup> De plus, les substances sécrétées par les mastocytes sensibilisent les récepteurs nociceptifs du côlon en diminuant leur seuil de sensibilité à la distension de cette partie du tube digestif.<sup>89</sup> Il existe une interaction entre le SNE, le système immunitaire gastro-intestinal et le SNC de sorte que l'état psychologique peut aussi causer divers troubles gastriques en activant la dégranulation des mastocytes.<sup>28, 75, 132</sup> Les symptômes provoqués sont les mêmes, que les mastocytes soient activés par une liaison antigène-anticorps ou qu'ils soient activés par les centres supérieurs lors d'un stress psychologique.

Lorsque que le programme neuronal d'alarme est activé, afin de protéger l'organisme, ceci provoque divers symptômes tels que des crampes abdominales, la diarrhée et bien d'autres.<sup>132</sup> Ces symptômes sont provoqués suite au déclenchement d'une forme spécialisée de motilité intestinale qui propulse rapidement et avec vigueur le contenu de l'intestin afin de l'évacuer le plus rapidement possible.<sup>117</sup> Le programme de défense stimule aussi de façon intensive les cellules sécrétrices de mucus afin de suspendre le contenu du tube digestif afin qu'il soit éliminé plus facilement.

Le système immunitaire entérique détecte les menaces antigéniques et établi une mémoire à long-terme de l'identité des différents antigènes rencontrés.<sup>131</sup> Certains facteurs neurotrophiques tels que GDNF, NT-3 et NGF semblent être des joueurs importants dans l'établissement de cette « mémoire intestinale » et cette idée est supportée par le fait qu'une augmentation de ces

facteurs trophiques ait été observée durant l'inflammation de l'intestin.<sup>39</sup> D'autres études indiquent qu'une première colite infectieuse rend l'intestin plus sensible au stress et induit des changements dans la fonction et le phénotype des neurones entériques (plasticité neuronale), ce qui mène à une réponse inflammatoire excessive lors d'un nouveau stress de même nature.<sup>18,</sup>  
<sup>132</sup> Cette hypersensibilité est à la base de plusieurs maladies intestinales telles que le syndrome de l'intestin irritable.<sup>43</sup>

## 2. NCAM ET PSA-NCAM

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) sont des protéines nécessaires pour la liaison des cellules entre elles ainsi qu'avec la matrice extracellulaire. Les CAM se divisent en deux grandes catégories : les CAM qui sont calcium-dépendantes (p. ex. cadherine, selectine et integrine) et les CAM qui sont calcium-indépendantes (p. ex. NCAM et L1).<sup>3</sup> Les molécules d'adhésion des cellules neuronales (NCAM) font parties de la deuxième catégorie et ont été les premières molécules d'adhésion à être isolées et caractérisées.<sup>31</sup> NCAM est l'une des molécules d'adhésion les plus abondamment exprimées chez les Vertébrés et des homologues de NCAM sont retrouvés chez plusieurs invertébrés telle que la sauterelle ce qui suggère que le mécanisme d'évolution de ces molécules d'adhésion ait été grandement conservé au cours de l'évolution.<sup>11,124</sup> En effet, la séquence d'acides aminés de NCAM demeure sensiblement la même chez toutes les espèces de vertébrés.<sup>31</sup>

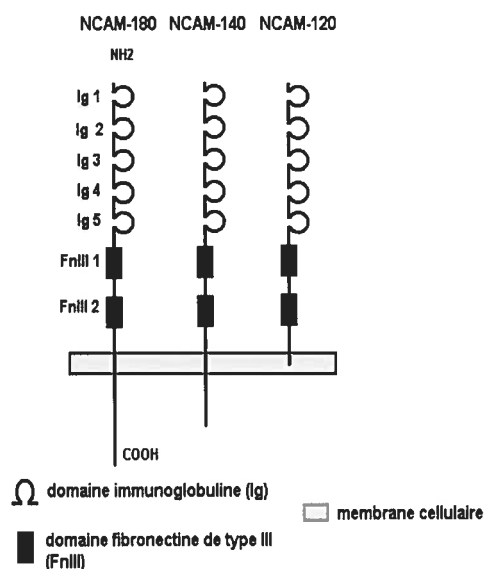
L'équilibre entre l'adhésion intercellulaire et la répulsion peut être modulé simplement par un changement dans le rapport de molécules qui promeuvent l'adhésion ou la répulsion. Par exemple, la modulation des niveaux d'expression des homologues de NCAM chez les Invertébrés, apCAM chez l'Aplasia et fascilin III chez la Drosophile, se fait respectivement par l'endocytose de la protéine ou par l'expression d'une protéine anti-adhésive, la protéine *beat*.<sup>4,6</sup> Toutefois, chez les Vertébrés, un mécanisme alternatif est disponible pour modifier les propriétés adhésives de NCAM, via la modification de sa structure. En effet, durant la vie embryonnaire et peu après la naissance, les NCAM subissent une modification post-transcriptionnelle qui

leur ajoute un sucre chargé négativement, l'acide polysialique (PSA). NCAM est la seule protéine des mammifères à laquelle l'acide polysialique s'attache.<sup>98</sup> Cette découverte suggère que l'évolution de l'acide polysialique, comme un régulateur des propriétés adhésives de NCAM chez les Vertébrés, puisse jouer un rôle plus critique dans la formation et le remodelage du système nerveux.<sup>6</sup> Durant la phase tardive de l'embryogenèse ainsi que durant la période périnatale du développement du système nerveux, NCAM est hautement polysialylé (jusqu'à 30% de son poids moléculaire total, soit environ 60 kDa, ce qui correspond à environ 200 résidus d'acide sialique) et est référé comme étant la forme embryonnaire de NCAM.<sup>20</sup>

## 2.1 Structure de NCAM

Les NCAM font partie des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines et elles sont encodées par un gène à une seule copie composé de 26 exons, situé dans le chromosome 11.<sup>2, 64, 98</sup> Chez les mammifères, divers isoformes sont produits par épissage alternatif, les trois principaux étant NCAM-120, NCAM-140 et NCAM-180, et ceux-ci sont différenciés par leur taille, soit 120, 140 et 180 kDa.<sup>60, 79, 83, 98</sup>

Chaque isoforme est formé de cinq domaines homologues aux immunoglobulines et de deux séquences de fibronectine de type III (figure 5).<sup>31, 83</sup> Les NCAM possèdent également trois régions distinctes : 1° une terminaison amine extracellulaire qui contient le site de liaison homophile, 2° une extrémité carboxyle associée avec la membrane cytoplasmique et le cytoplasme et 3° une région intermédiaire extracellulaire à laquelle s'attache la



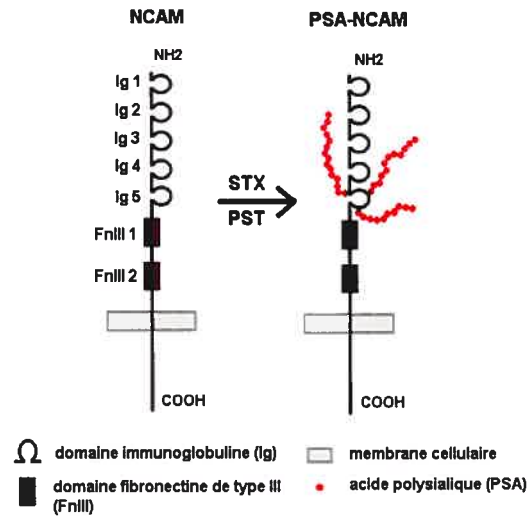
**Figure 5.** Structure de NCAM et les différents isoformes produits par épissage alternatif

chaîne d'acide polysialique, s'il y a lieu.<sup>60</sup> Les isoformes se différencient par la grandeur de leur domaine cytoplasmique ainsi que par leur mode d'association à la membrane cellulaire. NCAM peut être attaché la membrane cellulaire via une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (NCAM-120) ou être connecté au cytosquelette via un domaine transmembranaire (NCAM-140 et NCAM-180).<sup>6, 99, 124</sup> L'isoforme NCAM-180 est identique à l'isoforme NCAM-140 à l'exception d'une insertion de 261 acides aminés dans le domaine cytoplasmique.<sup>14</sup> Cette insertion confère la possibilité d'une interaction avec la spectrine, une protéine fibreuse du cytosquelette, ce qui diminue la mobilité latérale de NCAM-180. On retrouve en plus grandes quantités l'isoforme NCAM-140 dans les cônes de migration tandis que NCAM-180 est plutôt retrouvé aux sites de contacts cellulaires, où il est impliqué dans la stabilisation des synapses.<sup>14</sup> L'isoforme NCAM-120, quant à lui, est présent dans quelques neurones, mais est majoritairement exprimé par les cellules gliales.<sup>14, 124</sup>

## 2.2 Structure de PSA-NCAM

L'acide polysialique est un homopolymère relativement simple, composé de longues chaînes d'acide sialique lié- $\alpha$ 2-8 qui sont attachées exclusivement aux molécules d'adhésion des cellules neuronales.<sup>109</sup> L'acide polysialique s'attache à deux asparagines sur le cinquième domaine immunoglobuline de NCAM via une liaison de type N-glycan et cette opération se fait dans un compartiment du trans Golgi (figure 6).<sup>6, 64</sup> Les grandes chaînes d'acide sialique chargées négativement couvrent une grande surface et gardent l'eau liée.<sup>64</sup>





**Figure 6.** L'attachement de l'acide polysialique (PSA) à NCAM via les polysialyltransférases STX et PST

### 2.3 Régulation de l'expression de PSA-NCAM

La régulation de l'expression de PSA-NCAM se fait principalement par deux enzymes polysialyltransférases qui catalysent la liaison de PSA aux NCAM, soit PST (ST8SiaIV) et STX (ST8SiaII).<sup>115</sup> Ces deux enzymes sont hautement homologues avec 59% d'identité au niveau de la séquence en acides aminés.<sup>6, 8</sup> Les gènes codant pour STX et PST sont localisés respectivement sur le chromosome 15, bande q26 et sur le chromosome 5, bande q21.<sup>6, 8</sup> Ces deux enzymes subissent une régulation indépendante l'une de l'autre, mais elles sont souvent retrouvées dans les mêmes tissus au cours du développement normal.<sup>65, 108, 115</sup> L'enzyme STX est présente en plus grande quantité chez l'embryon et le nouveau-né, tandis que l'enzyme PST est présente tant chez l'embryon que chez l'adulte, à des niveaux plus bas, mais plus constants.<sup>8, 22, 35, 51</sup> Les deux enzymes sont capables d'initier et d'induire la polymérisation et la synthèse de l'acide polysialique et les patrons d'expression des ARNm de ces deux enzymes sont souvent corrélés avec les niveaux d'expression de PSA.<sup>6, 22, 51, 96</sup> Puisque PST et STX ont des propriétés enzymatiques distinctes et

qu'elles sont souvent exprimées dans les mêmes régions, il est fort possible que ces deux enzymes fonctionnent de façon coopérative plutôt que de façon compétitive.<sup>6</sup> Il a été démontré que la polysialylation de NCAM par PST et STX est plus importante que la somme combinée de la polysialylation de chaque enzyme dans des réactions différentes.<sup>6</sup> De ce fait, il est donc possible que lorsque NCAM est fortement polysialylé, ses propriétés adhésives soient d'autant plus diminuées que celles d'une NCAM faiblement polysialylé.<sup>6</sup>

L'ajout de précurseurs non-naturels d'acide sialique peut également modifier les propriétés adhésives de NCAM et ce, en inhibant de façon réversible l'expression de PSA à la surface de la cellule.<sup>76</sup> En effet, la voie de biosynthèse de l'acide sialique est assez permissive et permet la substitution du précurseur naturel, le N-acetyl-mannosamine, avec des dérivés synthétiques contenant quelques modifications.<sup>27</sup> Ces résidus artificiels de sucre sont générés par la conversion métabolique du N-acetyl-mannosamine synthétique ce qui produit soit du N-butanoyl-mannosamine (ManBut) soit du N-pentanoyl-mannosamine (ManProp).<sup>27</sup> Les polysialyltransférases STX et PST sont capables d'accepter ces sucres synthétiques et de les transférer aux NCAM, lors de la biosynthèse de PSA-NCAM dans un des compartiments de l'appareil de Golgi. Il semble que l'ajout de ManProp, qui possède un groupe méthylène de moins que ManBut, ne bloque pas la synthèse de PSA.<sup>27,76</sup> D'un autre côté, ManBut semble être un inhibiteur efficace.<sup>27</sup> En effet, ManBut interfère avec l'activité des polysialyltransférases ce qui résulte à une très faible sinon à aucune glycosylation de NCAM avant son exportation à la surface de la cellule.<sup>27</sup> Les effets de l'ajout de ManBut sont les mêmes que ceux observés suite à la digestion de PSA par l'enzyme endoneuraminidase (Endo-N), qui clive spécifiquement l'acide polysialique de NCAM, et ils sont réversibles. Cette découverte d'une alternative à la manipulation génétique et à la digestion enzymatique pour l'étude de la fonction de PSA a l'avantage d'être temporaire et réversible.<sup>76</sup>

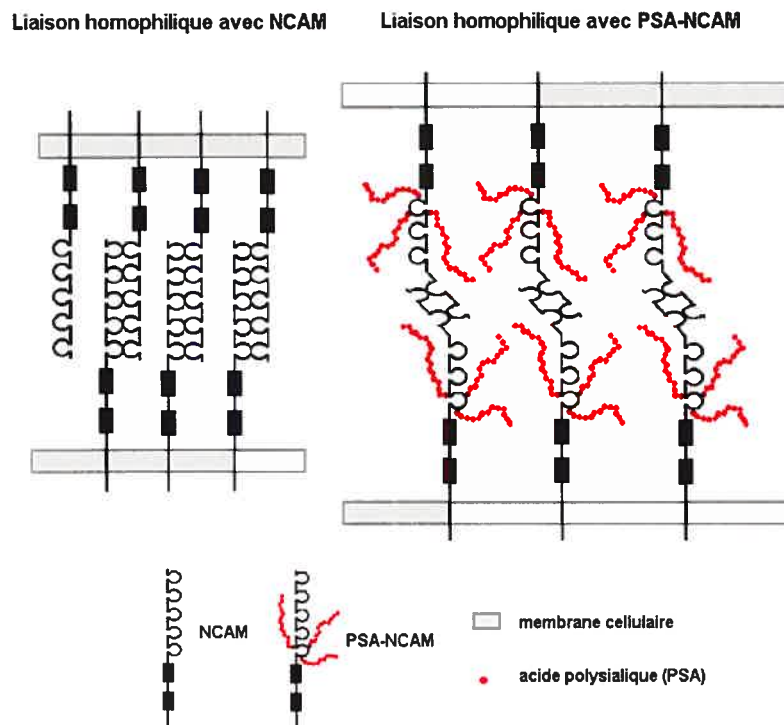
## 2.4 Fonctions de NCAM et de PSA-NCAM

### 2.4.1 L'adhésion cellulaire

Comme leur nom l'indique, les molécules d'adhésion font partie intégrante de la membrane externe des cellules et permettent principalement le regroupement cellulaire par l'entremise de liens homophiliques (NCAM avec NCAM) et hétérophiliques (NCAM avec diverses composantes de la matrice extracellulaire).<sup>51, 60, 103</sup> Ces interactions fournissent une certaine stabilité en établissant un ancrage physique des cellules à leur environnement.<sup>64</sup> Les interactions cellule-cellule, induites par les molécules d'adhésion cellulaire, jouent un rôle clé pendant l'embryogenèse en contrôlant les mouvements cellulaires, l'agrégation, la migration, la prolifération de même que la différenciation cellulaire.<sup>11, 51, 104, 109, 134</sup> La migration neuronale, la recherche axonale et la fasciculation des axones sont des processus fondamentaux qui sous-tendent la formation de connections synaptiques adéquates durant le développement et dépendent fortement de l'adhésion cellulaire.<sup>4, 14</sup> Ces processus sont gouvernés par l'interaction de molécules d'adhésion, de la matrice extracellulaire ainsi que des facteurs neurotrophiques et de leurs récepteurs.<sup>2, 103</sup> Le cône de croissance des neurones répond aux molécules d'adhésion et aux composantes de la matrice extracellulaire par des changements morphologiques rapides et des modifications du rythme de croissance.<sup>14</sup> Les NCAM se retrouvent à la surface des neurones, cellules gliales, cellules de Schwann et dans presque tous les tissus embryonnaires et adultes.<sup>60, 104</sup> Durant le développement, NCAM est fortement exprimé dans les structures dérivées du neuroectoderme et du mésoderme, comme la plaque neurale, le tube neural et les somites.<sup>2, 11, 64</sup>

L'habileté de NCAM à promouvoir l'adhésion cellulaire dépend de son degré de sialylation. En effet, à cause de sa structure linéaire et hélicoïdale ainsi que de ses propriétés chimiques, l'acide polysialique peut atténuer les interactions de NCAM en diminuant les forces d'adhésion entre les cellules et en les espaçant.<sup>4, 6, 20</sup> Lorsque des liaisons homophiliques sont médiées par

NCAM, les cinq domaines immunoglobuline sont impliqués dans l'adhésion de façon antiparallèle (figure 7). La présence de PSA sur le cinquième domaine immunoglobuline empêche toutefois un attachement aussi solide et puisque PSA prend beaucoup d'espace, les NCAM ne demeurent liées que par le premier et le second domaine (figure 7).<sup>64</sup> Puisque NCAM interagit avec d'autres molécules de façon hétérotypique tels que la molécule d'adhésion L1, des glycosaminoglycans et du collagène, il est fort possible que ces interactions soient aussi affectées par la présence de PSA.<sup>99, 103</sup> Une augmentation de l'espace intercellulaire peut, par ailleurs, procurer aussi un avantage en procurant la distance appropriée pour la liaison de certaines paires de ligand/récepteur à la surface de membranes opposées qui peuvent alors interagir ensemble.<sup>99</sup>



**Figure 7.** Effet de l'ajout de PSA sur les interactions homophiles de NCAM

## 2.4.2 La signalisation intracellulaire

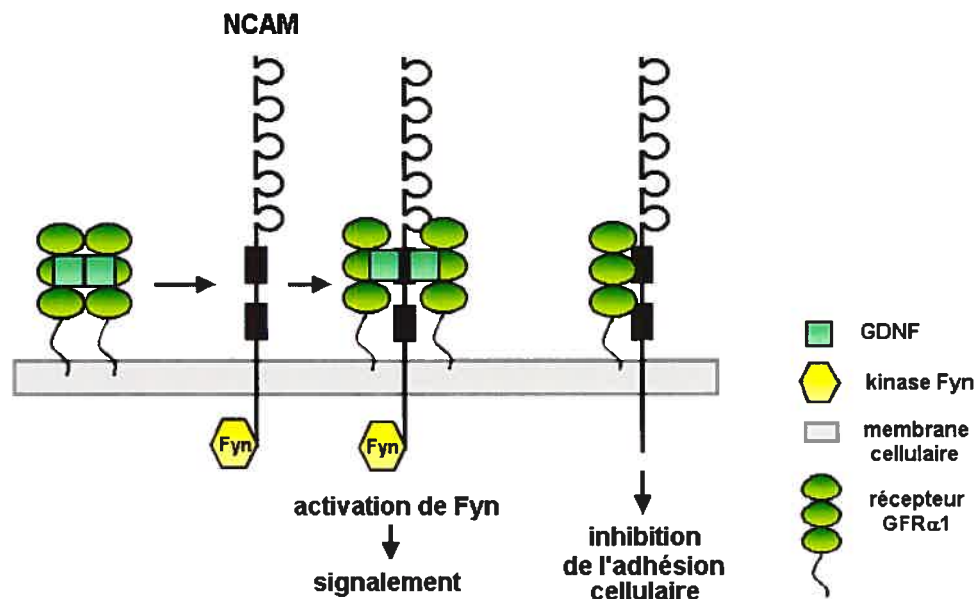
### 2.4.2.1 NCAM et la signalisation

Les radeaux lipidiques, des micro-domaines membranaires riches en sphingolipides et en cholestérol, sont d'importants joueurs dans le signalement cellulaire puisque leur composition lipidique crée un environnement plus ordonné et permet l'agglomération des molécules signalétiques et de leurs récepteurs.<sup>125</sup> Les radeaux lipidiques sont aussi riches en molécules d'adhésion munies d'une ancre GPI (TAG-1, NCAM-120).<sup>125</sup> En fait, l'adhésion et la signalisation sont des phénomènes interdépendants et il n'est donc pas surprenant de voir que les CAM peuvent aussi intervenir dans les cascades signalétiques intracellulaires qui sous-tendent les fonctions biologiques des cellules.<sup>64</sup> Les molécules d'adhésion jouent donc un rôle beaucoup plus complexe que le simple fait d'attacher mécaniquement les cellules les unes aux autres. De cette façon, la liaison homophile de NCAM peut activer des seconds messagers qui influenceront, entre autre, la croissance neuritique.<sup>11, 103</sup>

Une des boucles de signalement via NCAM implique la liaison de GDNF. La signalisation cellulaire via GDNF passe habituellement par la liaison de ce dernier à son récepteur spécifique, GFR $\alpha$ 1, qui recrute alors le récepteur à tyrosine kinase Ret.<sup>110, 111</sup> On a toutefois découvert récemment, dans des zones du cerveau exprimant vraiment plus de GFR $\alpha$ 1 que de récepteur Ret, que GDNF pouvait activer une voie de signalisation dans des cellules neuronales et gliales et ce, indépendamment de Ret.<sup>14</sup> Il a, par la suite, été démontré que NCAM (plus précisément, l'isoforme 140) est un récepteur alternatif pour GDNF (figure 8). En effet, le facteur neurotrophique GDNF se lie avec haute affinité au complexe GFR $\alpha$ 1-NCAM, ce qui active dans le cytoplasme la kinase Fyn ainsi que la kinase d'adhésion focale, FAK.<sup>14, 66, 103</sup> L'activation de ces kinases mène au déclenchement de la voie ras/MAPK qui induit la phosphorylation de ERK1 et ERK2.<sup>31, 114</sup> L'activation des voies Fyn et MAPK par NCAM, stimule la croissance neuritique.<sup>31</sup> Il a également été démontré que l'association de NCAM avec GFR $\alpha$ 1 mène à une réduction de

l'adhésion cellulaire médiée par NCAM et ce, en l'absence de GDNF (figure 8).<sup>111</sup>

Une autre voie de signalisation activée suite à la liaison homophile de NCAM implique l'association hétérophilique du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFr). Cette liaison cause la phosphorylation de FGFr ce qui active la phospholipase C puis la lipase DAG qui clive alors le diacylglycerol. Cette étape génère de l'acide arachidonique et cette molécule provoque alors l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants.<sup>98</sup> Le calcium est connu pour être une molécule signalétique clé dans la régulation du guidage du cône de croissance.<sup>49</sup> L'activation de FGFr permet aussi d'enclencher la boucle signalétique du complexe ras/MAPK, voie qui est aussi impliquée dans la promotion de la croissance des neurites.<sup>31</sup>



**Figure 8.** Le signalement Ret-indépendant de GDNF et GFR $\alpha$ 1 peut se faire via NCAM (D'après Sariola, 2003).

Les changements cellulaires stables associés au développement et à la différenciation requièrent une altération de l'expression des gènes.<sup>31</sup> La liaison homophile de NCAM peut aussi mener à l'inhibition de la prolifération des astrocytes et des neurones hippocampaux, suite à l'activation de facteurs de

transcription qui altèrent l'expression de certains gènes et cette opération se fait, entre autre, via l'activation du récepteur à glucocorticoïdes.<sup>69,98</sup>

#### 2.4.2.2 PSA-NCAM et la signalisation

Une étude a mis en évidence que l'altération des potentialisations à long terme (LTP) observée dans les hippocampes dépourvus de PSA-NCAM peut être rétabli avec l'ajout de BDNF et que cette altération des LTP serait liée à une diminution de l'activation de la cascade signalétique conduite par BDNF, voie de signalisation impliquée dans la plasticité synaptique ainsi que dans la survie et la différenciation des neurones corticaux.<sup>6,86</sup> Ceci suggère un nouveau mécanisme par lequel la haute charge négative de PSA-NCAM cause sa liaison avec ce facteur neurotrophique modulant ainsi les LTP en sensibilisant les cellules pyramidales à l'action de BDNF.<sup>64,86</sup> Parce que PSA-NCAM est exprimé à la surface de la cellule et aux synapses, cette molécule représente une façon d'amplifier ou d'augmenter spécifiquement l'action de BDNF aux synapses qui sont actives.<sup>22</sup> Le rôle modulateur de PSA sur BDNF pourrait être crucial durant le développement et la plasticité post-natale en ce sens que ces cellules seraient alors en compétition pour une quantité limitée de ce facteur de croissance.<sup>64</sup> De ce fait, les neurones ou synapses qui expriment plus de PSA-NCAM que les autres répondent plus à BDNF et ont un avantage sur les neurones qui expriment un niveau plus bas de PSA ou même pas du tout.<sup>64</sup> La présence de PSA ne serait donc pas un signal de migration en tant que tel, mais créerait plutôt une ouverture afin que la cellule puisse mieux répondre aux signaux externes appropriés.<sup>109</sup>

### 2.5 Rôle de NCAM et de PSA-NCAM dans le SNC: étude des souris mutantes

La forme polysialylée de NCAM joue un rôle non négligeable dans plusieurs aspects du développement et dans la plasticité du système nerveux.<sup>21</sup> Le patron d'expression de PSA-NCAM dans le système nerveux en

développement est hautement dynamique et sa forte présence durant la vie embryonnaire est liée à divers phénomènes tels que la recherche axonale, la migration cellulaire, la synaptogénèse ainsi que dans la formation du tissu musculaire.<sup>4, 13, 20, 22, 104</sup> Au cours de la maturation et de la différenciation, l'expression de PSA-NCAM diminue au profit de NCAM et la plupart des tissus qui expriment PSA-NCAM durant la vie embryonnaire tendent à réduire l'expression de ce carbohydrate au fur et à mesure que le tissu adulte se forme.<sup>22</sup> Certaines régions bien définies du SNC adulte continuent toutefois d'exprimer la forme polysialylée de NCAM.<sup>20, 104, 109</sup> C'est le cas du système olfactif, du noyau suprachiasmatique (impliqué dans la régulation des rythmes circadiens) et du gyrus denté de l'hippocampe, toutes des régions associées à un haut degré de remodelage et de plasticité.<sup>6, 20, 59</sup> Des expériences sur le fonctionnement de la mémoire ont démontré que la rétention des connaissances se fait via un remodelage des structures pré et post-synaptiques, un processus qui requiert la présence de PSA-NCAM pour l'affaiblissement des liaisons entre les neurones.<sup>83, 109</sup> La forme polysialylée de NCAM est donc importante dans la plasticité neuronale du cerveau adulte qui est associée à l'apprentissage et la régénération.<sup>104</sup> Ces observations corroborent l'idée selon laquelle la polysialylation de NCAM n'est pas une caractéristique de l'immaturité de la cellule, mais bien une caractéristique de sa capacité de changer sa morphologie et d'être mobile.<sup>20</sup>

Les études qui tentent d'identifier les fonctions de NCAM et de PSA-NCAM font souvent appel aux souris transgéniques. C'est en effet grâce à ces souris qu'on a pu démontrer le rôle de NCAM et de PSA-NCAM dans la formation des connections synaptiques ainsi que durant la plasticité post-natale du SNC.

### 2.5.1 Souris mutantes pour NCAM

Les premières souris invalidées à être générées ont été celles ayant une mutation pour le gène NCAM. Ces souris sont viables, fertiles, ne présentent pas de troubles digestifs et ne montrent que des changements mineurs dans l'histologie générale du cerveau.<sup>30</sup> Le peu d'effet de la mutation de NCAM



pourrait être dû au fait que les molécules d'adhésion NCAM et L1 soient co-exprimées dans plusieurs voies neuro-anatomiques et que le fait d'éliminer l'une ou l'autre des molécules d'adhésion soit minimisé par une compensation par l'autre. La double mutation de NCAM et de L1 cause toutefois une croissance axonale erronée et les souris meurent avant la naissance.<sup>30</sup> La présence de deux voies de régulation séparées permet donc de minimiser les erreurs durant le développement.

Les souris mutantes pour NCAM montrent, par contre, une réduction de l'ordre de 36% de la taille des bulbes olfactifs, plus spécifiquement dans la couche cellulaire granulaire, ainsi qu'une diminution de 10% dans le poids total du cerveau.<sup>30, 124</sup> Une accumulation de précurseurs neuronaux dans le courant migratoire rostral (RMS : rostral migratory stream), causant son élargissement par rapport aux souris normales, a également été observé.<sup>5, 6, 22,</sup>  
<sup>31</sup> Les bulbes olfactifs sont le premier relais de l'information olfactive dans le SNC. Cette région du cerveau contient une large population de petits interneurons et ces derniers sont d'un intérêt particulier puisqu'ils sont continuellement renouvelés chez l'adulte.<sup>5</sup> Les cellules précurseurs des interneurons sont générées dans la zone subventriculaire (SVZ) et migrent en association étroite les unes avec les autres en formant une chaîne jusqu'au bulbe olfactif à travers le RMS.<sup>5, 6</sup> Les jeunes neurones voyagent à travers un « tunnel » formé par les extensions des cellules gliales.<sup>5</sup> Cette migration tangentielle permet aux cellules de parcourir une plus grande distance que par la migration radiale ou axonale.<sup>22</sup> Ces neuroblastes expriment PSA-NCAM à leur surface et sa présence semble être cruciale pour les interactions intercellulaires durant la migration. En effet, lorsque l'acide polysialique est absent, soit par traitement à l'Endo-N, soit par la mutation de NCAM, la migration tangentielle dans le RMS est dérangée ce qui cause l'arrêt prématuré de la migration des précurseurs neuronaux.<sup>6</sup> La forte glycosylation de NCAM diminue l'adhésion cellulaire ce qui facilite les mouvements des cellules durant l'histogénèse et la morphogénèse du bulbe olfactif.<sup>5</sup>

La taille réduite des bulbes olfactifs chez les mutants a soulevé des questions sur leur odorat. Un test dans lequel les souris, mutantes et normales, devaient choisir entre une litière ayant une odeur attrayante et une litière ayant

une odeur repoussante (arrosée de jus de citron), a permis de démontrer que les souris mutantes pour NCAM pouvaient distinguer les odeurs normalement.<sup>30</sup>

Les souris mutantes pour NCAM montrent aussi des difficultés d'apprentissages spatiaux ainsi que des troubles dans le comportement d'exploration.<sup>30, 66</sup> En effet, le test du labyrinthe aquatique de Morris a permis de mettre en évidence, malgré l'absence de problème moteur, que les souris mutantes éprouvaient plus de difficultés que les autres à accomplir la tâche.<sup>30</sup> Ceci dénote une altération dans les capacités cognitives de ces souris. L'apprentissage spatial est associé avec la formation de synapses dans l'hippocampe, zone où PSA-NCAM est fortement exprimé tant chez l'embryon que chez l'adulte.<sup>6</sup> Il est donc facile de croire que la perte de PSA-NCAM chez les souris mutantes affecte la formation des synapses dans cette région créant ainsi une difficulté d'apprentissage.<sup>6</sup>

Deux formes de changements à long-terme peuvent être produites aux synapses excitatrices. La première est la potentialisation à long terme (LTP), qui est induite par de brèves périodes de stimulation à haute fréquence, et qui résulte à une augmentation de l'efficacité de la transmission.<sup>87</sup> La seconde est la dépression à long terme (LTD), induite par de longues périodes de stimulations à basse fréquence, résulte à une réduction de l'efficacité synaptique.<sup>87</sup> L'induction de ces deux sortes de changements requiert l'activation du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et une entrée de calcium dans le bouton post-synaptique.<sup>87</sup> Cette augmentation de calcium intracellulaire active différentes cascades d'événements signalétiques. Une autre conséquence de la mutation de NCAM est une défaillance à produire ces potentialisations et dépressions à long terme (LTP et LTD) dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe.<sup>6, 64</sup> Les formes de plasticité à court-terme, d'un autre côté, ne semblent pas être affectées par la mutation de NCAM.<sup>87</sup>

NCAM et PSA-NCAM sont donc requis pour l'induction de LTP, qui sous-tend l'apprentissage et la mémoire.<sup>86</sup> Il a été démontré que les souris déficientes pour NCAM ou des sections d'hippocampe traitée avec l'enzyme Endo-N, ont des potentialisations à long terme défectueuses.<sup>22</sup> Puisque PSA-NCAM est exprimé aux synapses et que son expression est modulée par

l'activité synaptique et neuronale, il est proposé que PSA-NCAM soit un modulateur important dans la plasticité de l'hippocampe.<sup>21, 86</sup> Ce serait grâce à ses propriétés anti-adhésives que PSA-NCAM induirait le remodelage des membranes synaptiques.<sup>86</sup>

### 2.5.2 Les souris mutantes pour l'enzyme PST

L'étude des souris mutantes pour NCAM a démontrée, de façon convaincante, que l'acide polysialique est requis dans certaines formes de plasticité synaptique dans le cerveau des mammifères. Toutefois, à cause de l'absence de PSA et de NCAM, tout au long du développement ainsi que chez l'adulte, la distinction entre les phénomènes reliés à la perte de PSA ou de NCAM ne peuvent être dissociés. En laissant la protéine NCAM intacte, cela permet une discrimination plus efficace des rôles de chacune des protéines. Puisque deux enzymes sont responsables de l'attachement de PSA à NCAM et qu'elles ont un patron d'expression temporel et spatial distinct, il est possible d'empêcher l'expression de PSA-NCAM dans certains types de tissus ou de cellules ainsi qu'à certaines périodes du développement en introduisant une mutation dans le gène de l'une ou l'autre des enzymes.<sup>56</sup> Dans cette optique, en n'introduisant une mutation que dans le gène codant pour l'enzyme polysialyltransférase PST, on permet l'expression normale de l'enzyme STX, qui est prédominante durant le développement, et par le fait même celle de PSA-NCAM durant cette même période. Ceci permet aux souris homozygotes pour la mutation d'avoir un développement normal et une morphologie structurale adéquate.<sup>35</sup> Contrairement aux souris déficientes pour NCAM, les cellules précurseurs dans le RMS expriment PSA et suivent leur voie de migration normale, il n'y a donc pas de changements observés dans la taille des bulbes olfactifs, et les fibres moussues de la région CA3 montrent une lamination normale.<sup>30</sup> Aucune perte de PSA n'a été observée dans le RMS chez l'adulte suggérant, que dans cette région, la polysialylation de NCAM continue de s'effectuer par l'enzyme STX.<sup>35</sup>

Les souris adultes mutantes pour PST montrent toutefois une perte importante de PSA dans la majorité des régions du cerveau, en comparaison au phénotype sauvage, et plus spécifiquement dans les régions CA1 et CA3-CA4 de l'hippocampe.<sup>35</sup> Cette absence cause une défaillance dans l'induction de LTP et de LTD uniquement aux synapses des collatérales de Schaffer dans la région CA1 de l'hippocampe, ce qui prouve, une fois de plus, le rôle essentiel que joue PSA dans la plasticité synaptique à cet endroit.<sup>35</sup> D'un autre côté, la plasticité synaptique dans la région CA3 ne semble pas être affectée par la disparition de PSA chez les souris PST *-/-*, contrairement à ce qui a été démontré chez les souris déficientes pour NCAM.<sup>30</sup> Cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'altération des LTP et LTD dans la région CA3 chez ces souris soit due à la distribution éclectique des fibres moussues suite au manque d'acide polysialique durant le développement embryonnaire de cette région.<sup>35</sup> Un défaut du développement ne peut pas être mis en cause dans l'altération des LTP et des LTD dans la région CA1, puisque le développement se fait normalement grâce à la présence de l'enzyme STX. Ces observations démontrent donc une plasticité synaptique défectueuse dans les synapses NMDA-dépendante (région CA1) et une plasticité synaptique normale dans les synapses NMDA-indépendante (région CA3).<sup>35</sup> Ceci suggère, de façon plus précise, que PSA est un déterminant important dans certaines, mais pas toutes les formes de plasticité neuronale dans l'hippocampe.

Récemment disponible, la souris mutante pour l'enzyme polysialyltransférase STX ne présente pas les mêmes anomalies observées chez la souris mutante pour l'enzyme PST. Les effets de la mutation sont moins importants et se résument à une modification du ciblage axonal des fibres moussues hippocampales issues du gyrus denté qui forment des associations ectopiques dans la région CA3a de l'hippocampe, région beaucoup plus éloignée que la région CA3c dans laquelle les fibres font normalement synapse.<sup>7</sup> Ce changement dans l'arrangement infrapyramidal des fibres moussues est associé avec une augmentation du comportement d'exploration et une diminution des réponses comportementales de peur.<sup>7</sup> L'étude d'une souris mutante pour les deux enzymes pourrait éventuellement nous en dire un peu plus long sur les fonctions de PSA.

Ces résultats supportent l'idée que les niveaux d'expression de NCAM et de PSA-NCAM sont importants non seulement lors de la migration, la croissance axonale et bien d'autres phénomènes, mais qu'ils sont aussi importants dans les formes de plasticité à long-terme tels que les LTP et les LTD. Chez l'Aplasia, le pendant de NCAM, apCAM, est aussi impliqué dans la plasticité synaptique à long terme et la potentialisation synaptique est associée à l'enlèvement de apCAM de la surface de la cellule par endocytose.<sup>87</sup> La formation d'un environnement anti-adhésif semble donc être nécessaire pour la réorganisation synaptique.<sup>87</sup>

### 3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les interactions entre les surfaces cellulaires sont essentielles pour la reconnaissance cellulaire, la migration durant le développement ainsi que dans la stabilisation subséquente des tissus chez l'adulte. On sait aussi que ces interactions revêtent un intérêt particulier dans l'adhésion entre les neurones entériques et les cellules gliales à l'intérieur des plexus entériques, puisque ceux-ci sont souvent sollicités suite à leur exposition continue aux stress mécaniques. Des études chez le rat et chez l'humain ont déjà démontré que NCAM est en effet exprimé sur les neurones et cellules gliales dans l'intestin fœtal et adulte.<sup>84, 102</sup> Toutefois, l'expression de PSA-NCAM n'a toujours pas été étudiée dans le système nerveux entérique, malgré le fait que plusieurs études biochimiques, immunochimiques et immunohistochimiques ont mis en évidence le rôle crucial de cette glycoprotéine membranaire durant le développement et la plasticité post-natale du système nerveux central.<sup>4, 20, 22</sup>

Puisqu'il existe plusieurs similitudes entre le système nerveux entérique et le système nerveux central, en terme d'indépendance fonctionnelle, d'organisation structurale et de ressemblance entre les phénotypes neurogliaux, et que PSA-NCAM joue un rôle si important dans le SNC embryonnaire et mature, ces observations nous ont mené à postuler l'hypothèse

selon laquelle PSA-NCAM serait exprimé dans le système nerveux entérique au cours de son développement. En effet, ce dernier étant doté d'une grande capacité d'adaptation, il est fort probable que PSA-NCAM puisse être exprimé à la surface des éléments neuronaux qui constituent le SNE.

De cette étude, il nous sera possible, en premier lieu, de décrire clairement, à l'aide de l'immunofluorescence, la distribution temporelle et spatiale de PSA-NCAM et de NCAM dans le système nerveux entérique du rat au cours de son développement normal. Une bonne description de la distribution cellulaire de cette molécule d'adhésion polysialylée nous fournira des bases utiles pour d'éventuelles études fonctionnelles et biochimiques. En deuxième lieu, l'expression de PSA-NCAM sera étudiée au cours de la réponse inflammatoire. Puisque plusieurs mécanismes d'adaptation et de réorganisation sont mis en route lors de l'inflammation, il sera intéressant d'évaluer l'expression de PSA-NCAM, toujours à l'aide de l'immunofluorescence, au cours de ces processus. De ce fait, il sera ainsi possible de postuler un rôle pour la forme polysialylée de NCAM dans une situation pathologique.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## II. Matériel et Méthodes

---

### 1. ANIMAUX

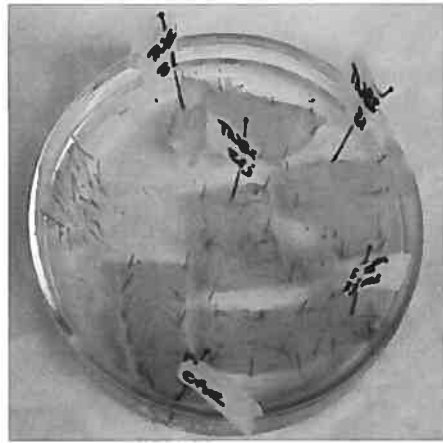
Toutes les expériences décrites ci-dessous ont été effectuées avec des rats Sprague-Dawley, des deux sexes, commandés chez le fournisseur Charles River. Les rats sont élevés sous des conditions de nourriture et d'eau *ad libitum* ainsi qu'un cycle de 12 heures de lumière par jour. Puisque notre projet étudie l'expression de PSA-NCAM au cours du développement, des rats de différents âges ont été utilisés; des embryons de 12 à 20 jours (provenant de rates gestantes commandées chez Charles River dont le stade exact de gestation est déterminé; la présence d'un bouchon muqueux indique le début de la gestation et ce stade est considéré comme étant E 1) ainsi que des rats âgés de 1 à 90 jours. Les rats sont sacrifiés de différentes manières selon leur âge et leur poids. Les embryons sont prélevés individuellement par césarienne puis ceux-ci sont décapités rapidement à l'aide de ciseaux chirurgicaux. Les nouveau-nés, jusqu'à ce qu'ils soient âgés de 14 jours, sont sacrifiés par injection intrapéritonéale de penthobarbital (120 mg/kg, Euthanyl à 240 mg/ml). Les rats plus âgés sont sacrifiés dans une chambre à CO<sub>2</sub>. Une fois les rats sacrifiés, l'abdomen est ouvert avec des ciseaux fins en prenant soin de ne pas abîmer le tube digestif. Les différentes portions du système digestif sont ensuite prélevées (jéjunum, iléon, côlon), en coupant le mésentère le plus près possible de l'intestin. Les tissus sont recueillis et déposés dans du tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7.4, 0.1 M) et mis sur de la glace. Toutes ces méthodes sont approuvées par le Comité Institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche du Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.



## 2. PRÉPARATION DES TISSUS

### 2.1 Préparation des tissus pour la microscopie optique

Les spécimens sont nettoyés de leur contenu avec un tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7.4, 0.1 M), déposés dans une solution de PBS 1X-nifédipine 1 $\mu$ M (Sigma-Aldrich, # N-7634) pendant 10 minutes (ceci cause la relaxation des muscles), puis ils sont rincés à nouveau dans du PBS 1X (3 fois 10 minutes). Sections : Les tissus sont fixés dans du paraformaldehyde 4% (dans du PBS 1X pH 7.4 0.1 M, Sigma-Aldrich, # P6148) pendant 3 à 4 heures à température pièce, ils sont ensuite rincés dans du PBS 1X (4 fois 20 minutes). Préalablement à la congélation des tissus, ceux-ci sont déposés dans une solution de sucrose 15% (Sigma-Aldrich, # S-7903) pour 15 minutes puis ils sont transférés dans une solution de sucrose 30% pour au moins 12 heures à 4°C. Les tissus sont alors déposés dans des récipients d'enrobage remplis de Tissue-Tek-OCT (Electron Microscopy Science, # 62550-12), puis ils sont congelés par immersion dans de l'azote liquide. Les blocs sont ensuite entreposés dans un congélateur à -80°C. Les coupes, d'une épaisseur de 10  $\mu$ m, sont générées à l'aide d'un Cryostat microtome, dont la température de la chambre est de -20°C. Elles sont recueillies sur des lames préalablement silanisées ((3-Aminopropyl)-triéthoxysilane, Sigma-Aldrich, # A-3648) ce qui augmente l'adhésion des coupes à la surface de la lame. Celles-ci sont gardées dans un boîtier et entreposées dans un congélateur à -20°C jusqu'à leur traitement par immunofluorescence. Préparations entières : Tous les spécimens de tubes digestifs sont ouverts le long de la bordure mésentérique puis ils sont rincés. Les carrés de tissus fraîchement disséqués sont épinglés dans un pétri rempli de silicone (Paisley, # 184 Sylgard) de sorte que les tissus soient tendus le plus possible (voir figure 9). La fixation se fait avec du Duboscq-Brazil (300 ml d'éthanol 80%, 120 ml de formaldéhyde 37% (Fisher, # BP-531500), 30 ml d'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich, # A-6283) et 40 ml d'acide picrique saturé (Fisher, # LC-186701) pendant 3 à 4 heures à température-pièce. Une fois la fixation terminée, les tissus sont rincés avec du PBS 1X (4 fois 20 minutes). La dissection « whole-mount » se fait dans un pétri rempli de PBS



**Figure 9.** Montage des tissus frais pour la fixation

1X et requiert des instruments chirurgicaux de haute précision: des pinces fines (Dumont no. 5 (Fine Science Tools., # 11252-30) et Dumont no. 5/45 (Fine Science Tools, # 11251-35), des ciseaux chirurgicaux et un microscope à dissection.<sup>112</sup> Tout d'abord, la muqueuse et la sous-muqueuse sont enlevées. Par la suite, la couche musculaire lisse circulaire est

pelée de sorte que le plexus myentérique, ainsi que la couche musculaire longitudinale à laquelle il s'adhère, restent. Le plexus sous-muqueux, quant à lui, demeure collé à la sous-muqueuse lorsque cette dernière est dissociée des couches musculaires. Puisque la muqueuse et la sous-muqueuse sont très épaisses, il n'est pas possible de bien visualiser le plexus sous-muqueux si elles restent là, il faut donc les retirer en les gratter doucement avec une pince dont l'extrémité est à 45 degrés de sorte qu'il n'en résulte qu'une mince pellicule, le plexus sous-muqueux. Les minces couches de tissus sont ensuite déposées directement sur une lame et sont prêtes à être traitées pour l'immunofluorescence. Les tissus ne doivent jamais sécher tout au long de ce processus et ils baignent donc dans une solution de PBS 1X en tout temps.

## 2.2 Préparation des tissus pour la microscopie électronique

Les tissus (jéjunum, iléon et côlon) sont prélevés, nettoyés et sectionnés en rondelles de 2-3 mm puis ils sont fixés pendant 2 heures à température-pièce dans du glutaraldehyde 1% (dans du tampon phosphate 0.1M pH 7.4). Les tissus sont ensuite lavés avec du tampon phosphate 0.1M pH 7.4 (2 fois 5 minutes, à 4°C). Afin de préserver une meilleure antigénicité, l'enrobage des tissus se fait dans du Lowicryl K4M. Les tissus sont alors déshydratés dans des degrés croissants de méthanol : 1° 5 minutes dans du méthanol 30% à 4°C, 2° 5 minutes dans du méthanol 50% à 4°C, 3° 5 minutes dans du méthanol 70% à -10°C, 4° 30 minutes dans du méthanol 90% à -20°C.<sup>16</sup> L'infiltration de la

résine se fait comme suit, toujours à  $-20^{\circ}\text{C}$  et dans des capsules de gélatine : 1<sup>o</sup> 1 heure dans du Lowicryl et méthanol 90 % dans des proportions de 1:1, 2<sup>o</sup> 1 heure dans du Lowicryl et méthanol dans des proportions de 2 :1, 3<sup>o</sup> 1 heure dans du Lowicryl seul, 4<sup>o</sup> toute la nuit dans du Lowicryl.<sup>15</sup> Le Lowicryl K4M est préparé en mélangeant 4 g d'agent polymérisateur, 26 g de monomère et 0,15 g d'initiateur. L'ajout de 5 à 10% d'eau distillée au mélange augmente la rétention de l'antigénicité.<sup>15</sup> La polymérisation de la résine se fait sous une lampe UV pendant 5 à 7 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$ .<sup>15</sup> De fines tranches sont obtenues à partir des blocs de tissus et les sections sont recueillies sur des grilles de nickel recouvertes d'un film de support (Parlodion et carbone).<sup>15</sup> Les grilles sont alors prêtes pour l'immunocytochimie à l'or colloïdal.

### 3. INDUCTION DES COLITES

Ce protocole, qui est basé sur des méthodes éprouvées, largement utilisées dans le domaine d'étude des maladies intestinales, a été accepté par le Comité de déontologie en soins des animaux. Cette expérience a été effectuée sur des rats Sprague-Dawley adultes (250 grammes et plus) et a été répétée à trois reprises. Pour chaque expérience, 20 rats ont été utilisés. L'inflammation colique a été induite suite à l'injection de 0,5 ml de TNBS (2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid solution, Sigma-Aldrich, # P2297) à une concentration de 40 mg/ml. Cette concentration est atteinte en diluant le TNBS dans de l'éthanol 50%. De ce fait, il a fallu prévoir des rats-contrôles injectés avec de l'éthanol 50% uniquement, ainsi que des rats injectés avec une solution saline (0,9 g NaCl /100 ml). Préalablement à l'injection, les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane à 3-4 % (Abbott Laboratories, # 02026635). Ce type d'anesthésie se fait par les voies respiratoires et requiert le port d'un masque recouvrant la bouche et le nez de l'animal en tout temps. Une fois l'animal endormi, on insère par l'anus, à une profondeur de 7cm, un cathéter d'une grosseur de 8 French. On injecte alors 0,5 ml de solution (TNBS/éthanol 50%, éthanol 50% ou saline). Ceci fait, on ferme l'anus avec une agrafe et on soulève le bassin de l'animal, afin d'éviter le plus possible le reflux du produit. L'animal demeure dans cette position environ 20 minutes, toujours sous

anesthésie. Une fois ce laps de temps écoulé, on retire l'agrafe et on dépose l'animal dans sa cage où il se réveillera 5 à 10 minutes plus tard.

À chaque stade d'évaluation des colites (après 1, 3, 7 et 21 jours suite à l'induction des colites), trois rats traités avec du TNBS, un rat traité avec de l'éthanol 50% et un rat traité avec de la saline sont sacrifiés dans une chambre à CO<sub>2</sub> puis pesés. Les signes cliniques externes de maladie sont évalués avant (diarrhée, irritation de l'anus, sang dans les selles) et pendant la dissection (inflammation, épaissement de l'épithélium, infiltration graisseuse et autres). En plus de la région d'intérêt, soit le côlon à 7 cm de l'anus, une partie du côlon non atteinte par l'inflammation a aussi été prélevée pour fin d'analyse. Ceci nous servira de contrôle interne afin de vérifier si les conséquences de l'inflammation pouvaient se répercuter à des régions au-delà de la zone irritée. Les tissus sont fixés selon le protocole pour les préparations entières dans du Duboscq-Brazil et disséqués selon la méthode du « whole-mount » pour enfin être traités pour l'immunofluorescence. Des fragments d'intestin, prélevés dans les régions d'intérêt, sont aussi recueillis afin que le degré d'inflammation soit évalué par un pathologiste. Ces tissus sont alors fixés dans du formol 10%, déshydratés dans des gardiens croissants d'alcool, puis enrobés dans de la paraffine. Des sections de tissus sont ensuite coupées et colorées (hématoxyline – éosine). L'évaluation histologique a été faite à l'aveugle par un pathologiste, selon des critères mentionnés ci-dessous.

#### 4. ÉVALUATION DE LA SÉVÉRITÉ DES COLITES

Le système d'évaluation des colites fait appel tant aux caractéristiques macroscopiques (tableau I) qu'histologiques (tableau II).<sup>81</sup> Il est à noter que les critères d'évaluation histologiques ont été quelque peu modifiés afin d'évaluer aussi les événements qui surviennent durant la réparation cellulaire.

**Tableau I.** Critères utilisés pour évaluer les dommages macroscopiques suite à l'induction de colites avec l'injection de TNBS dans le côlon chez le rat

Pointage	Paramètre
0	Aucun dommage
1	Hyperhémie sans ulcère
2	Hyperhémie et épaissement de l'épithélium, sans ulcère
3	1 site d'ulcération sans épaissement de la paroi intestinale
4	2 sites ou plus d'ulcération ou inflammation
5	0,5 cm d'inflammation et de dommages majeurs
6-10	1 cm de dommages majeurs (1 point de plus à chaque 0,5 cm de dommage, jusqu'à la concurrence de 10 points)
0 ou 1	Absence ou présence de diarrhée
0 ou 1	Absence ou présence de resserrement pathologique (striction)
0,1 ou 2	Absence ou présence (modérée ou sévère) d'adhérences

**Tableau II.** Critères utilisés pour l'évaluation histologique de la sévérité des colites induites par l'injection de TNBS dans le côlon chez le rat

	Pointage	Paramètre
	0, 1, 2 ou 3	Étendue de la destruction de l'architecture normale (normal, léger, modéré ou sévère)
<b>Colite</b>	0, 1, 2 ou 3	Présence et degré d'infiltration cellulaire (normal, léger, modéré ou infiltration trans-murale)
	0 ou 1	Présence ou absence d'abcès dans les cryptes, ulcération
	0 ou 1	Présence ou absence de réduction des cellules de gobelet, mucosécrétion
<b>Réparation</b>	0 ou 1	Présence ou absence d'épaississement fibreux de la sous-muqueuse
	0 ou 1	Présence ou absence d'un aspect plat de la muqueuse
	0 ou 1	Présence ou absence d'une diminution de l'épaisseur de la muqueuse
	0 ou 1	Présence ou absence d'hyperplasie de la <i>muscularis mucosae</i>
	0 ou 1	Présence ou absence d'hyperplasie de la musculature

## 5. IMMUNOFLUORESCENCE

La technique d'immunofluorescence a été utilisée sur des coupes congelées d'intestin de stades embryonnaires (E12 à E20) et post-nataux (P1 à P90) ainsi que sur des préparations entières d'intestins, normaux ou enflammés, de stades post-nataux. On trace d'abord le contour des coupes avec un crayon spécial (PapPen, Electron Microscopy Science, # 71312-B) qui imperméabilise le pourtour des coupes et empêche l'écoulement des liquides, ce qui empêche une déshydratation rapide des coupes. Les coupes sont par la suite réhydratées pendant 10 minutes en ajoutant 200  $\mu$ L de PBS 1X sur chacune des lames (coupes congelées). À partir de ce moment, les coupes ne doivent pas sécher avant la fin de l'expérience et c'est pourquoi les lames sont déposées dans une boîte humidifiée. Le temps écoulé, le PBS est aspiré et il est remplacé par 200  $\mu$ L d'une solution de PBS 1X-Triton X-100 0,1 % (Triton X-100: Sigma-Aldrich, # S-5340) pour 10 minutes. Le Triton X-100 est un détergent qui permet de perméabiliser la membrane des cellules, ce qui facilite la pénétration des anticorps dans le tissu. Cette solution est aspirée et remplacée par du PBS 1X-Triton X-100 0,1 %-NGS 10% (NGS (sérum normal de chèvre): Sigma-Aldrich, # G9023) pour 1 heure à la température de la pièce. Cette étape permet de bloquer les sites non-spécifiques et diminuer le bruit de fond. Vient ensuite le temps d'ajouter les anticorps primaires. Ceux-ci sont dilués dans une solution de PBS 1X-Triton X-100 0,1%-NGS 4% qu'on incube toute la nuit à 4 °C. Les concentrations et types d'anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau III. La première protéine que nous voulons mettre en évidence est PSA-NCAM et l'anticorps utilisé reconnaît les PSA  $\alpha$ -2,8-liés sur NCAM avec une chaîne d'une longueur supérieure à 12 résidus.<sup>106</sup> Afin d'identifier les cellules qui expriment PSA-NCAM, nous avons fait des immunofluorescences avec un double marquage avec différents marqueurs cellulaires, tels que PGP9.5 (protein gene product 9.5), qui marque spécifiquement la forme neuronale d'une enzyme ubiquitine hydroxylase,<sup>33, 97</sup> S100b, qui marque les cellules gliales immatures et matures, et un anticorps anti-desmine, qui marque les fibres musculaires. Un anticorps anti-NCAM a aussi été utilisé et ce dernier reconnaît deux des trois principaux isoformes de

NCAM, les isoformes 140 et 180 kDa.<sup>32</sup> À toutes les expériences, des contrôles de spécificité des marquages ont été effectués par omission des différents anticorps primaires. Dans tous les cas, l'omission des anticorps primaires ne permet pas de détecter l'expression de protéines non-spécifiques, ce qui nous permet de conclure que les marquages que nous observons sont spécifiques aux protéines que nous voulons détecter. Après l'incubation des anticorps primaires suivent 3 rinçages de 10 minutes avec du PBS 1X. On incube ensuite les lames avec les anticorps secondaires appropriés, 2 heures à 4°C. Les concentrations et types d'anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau IV. S'en suit trois rinçages de 10 minutes chacun avec du PBS 1X, puis on incube les lames 1 heure à la température de la pièce, avec de la Streptavidine conjugué-Cy<sup>TM</sup>3, diluée toujours dans du PBS 1X-Triton X-100 0,1%-NGS 4%. Cette étape ne se fait que si l'on a utilisé un anticorps secondaire biotinylé (anti-PSA-NCAM ou anti-NCAM). On termine ensuite avec un rinçage de 10 minutes avec du PBS 1X, un rinçage de 10 minutes avec du PBS1X-Triton X-100 0,1% et deux rinçages de 5 minutes avec du PBS 1X. On monte alors les lames avec un milieu de montage aqueux fait pour préserver le plus longtemps possible la fluorescence, le fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, # 17984-25). Les lames sont alors prêtes à être regardées au microscope. Pour ce faire, nous avons utilisé un microscope Zeiss axioskop FL (Carl Zeiss, Allemagne) pour regarder les lames et effectuer les comptages cellulaires requis ainsi qu'un microscope à fluorescence Leica DM RE (Leica Microsystem, Allemagne) équipé de filtres FITC/Bodipy/Fluo3/DiO (longueur d'onde de 450 nm à 650 nm) et CY3.5 (longueur d'onde de 540 nm à 740 nm) et d'une caméra Leica numérique DC 300F (Leica Microsystem, Allemagne) pour prendre les photos.

**Tableau III.** Anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps	Hôte	Dilution	Type	Poly ou monoclonal	Source
PSA-NCAM	Souris	1 : 300	IgM	monoclonal	Chemicon International # MAB- 5324
PGP9.5	Lapin	1 : 400	IgG	polyclonal	Biogenesis, # 7863-0504
Anti-desmine	Lapin	1 : 50	IgG	polyclonal	Abcam, # ab-8592
S100b	Lapin	1 : 50	IgG	polyclonal	DakoCytomation, # A-5110
NCAM	Souris	1 : 10	IgG	monoclonal	Immunogene, # AG-1

**Tableau IV.** Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps primaires	Dilution	Anticorps secondaire	source
PGP9.5, anti-desmine et S100b	1 : 400	Anti-IgG de lapin fait dans la chèvre alexa fluor® 488	Molecular Probe, # A-11008
PSA-NCAM	1 : 200	Anti-IgM de souris fait dans la chèvre biotinylé	Vector Laboratories, # BA-2020
NCAM	1 : 200	Anti-IgG de souris fait dans la chèvre biotinylé	Vector Laboratories, # BA-9200
PSA-NCAM et NCAM	1 : 2000	Strptavidine conjuguée-Cy3	Jackson Immunoresearch Laboratories, # 016-160-084

## 6. IMMUNOCYTOCHIMIE À L'OR COLLOÏDAL

Tout d'abord, dans un pétri dont le fond est couvert de cire dentaire, on crée une chambre humide. Ensuite, on dépose une goutte de PBS 1X (20µL) et on dépose la grille sur sa surface, en s'assurant que le côté ayant les sections de tissu soit en contact direct avec le liquide, et on laisse les coupes s'hydrater une minute. Il est important que la face ne contenant pas les coupes ne soit pas exposée aux différents réactifs afin d'éviter toute contamination. On transfère ensuite la grille sur une goutte de sodium métapériodate saturé (NaIO<sub>4</sub>) (20 µL) environ 8 minutes. Cet agent oxydant permet de dévoiler les sites antigéniques en décapant un peu la surface de la coupe. On effectue ensuite trois rinçages de 5 minutes pour effacer toutes traces de NaIO<sub>4</sub>. Pour ce faire, on dépose la grille



dans un des puits d'une plaquette de porcelaine remplie de PBS 1X; on transfèrera la grille dans d'autres puits pour les rinçages successifs. Pour augmenter l'efficacité des rinçages, on place la plaquette de porcelaine sur une plaque magnétique afin que les grilles tournent sur elles-mêmes. Ceci fait, les grilles sont placées sur une goutte de glycine 0,15M (20  $\mu$ L) pour 20 minutes, puis elles sont transférées sur une goutte de PBS 1X (20 $\mu$ L) 1 minute et ensuite sur une goutte d'ovalbumine 1% (dans PBS) (20  $\mu$ L) pour 30 minutes (afin de bloquer les sites non-spécifiques). Ce laps de temps écoulé, le moment est venu de transférer les grilles sur une goutte d'anticorps dilué (10  $\mu$ L). Certains des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence seront aussi utilisés pour l'immunocytochimie à l'or colloïdal, soit l'anti-PSA-NCAM (Chemicon International, # MAB5324) et l'anti-PGP 9.5 (Biogenesis, # 7863-0504). Tous deux sont utilisés à des concentrations de 1 : 50 et dilués dans du PBS 1X. Les grilles incubent pendant 2 heures à température-pièce. S'en suivent 3 rinçages de 5 minutes dans des bains de PBS 1X. On transfert ensuite les grilles de nouveau sur une goutte d'ovalbumine 1% (20  $\mu$ L) pour 15 minutes puis on les transfert sur une goutte d'anticorps secondaires (10  $\mu$ L) pendant 30 minutes, à température-pièce. Dans le cas de PGP 9.5, puisque c'est un IgG de lapin, on peut utiliser la protéine A conjugué à de l'or de 10 nm, une protéine bactérienne purifiée ayant des affinités élevées avec les immunoglobulines IgG. La protéineA-or est diluée dans du PEG/PBS 0,02%. En ce qui concerne l'anti-PSA-NCAM, puisque c'est un IgM de souris, on ne peut pas utiliser la protéineA-or et on doit donc utiliser un anticorps secondaire plus spécifique, soit l'anti-IgM de souris conjugué à de l'or colloïdal de 10 nm de diamètre développé dans la chèvre (Sigma-Aldrich, # G5652).<sup>16</sup> Cet anti-IgM a été utilisé à une dilution de 1: 5, toujours dans du PEG/PBS 0,02%. On effectue par la suite 3 rinçages de 5 minutes dans des bains de PBS 1X, afin d'éliminer toute trace d'or non-lié, ainsi qu'un rinçage avec un jet de PBS pendant 30 secondes et un jet d'eau distillée pendant 30 secondes également. Pour le rinçage par jet, on prend la grille avec des pinces et on dirige le jet du flacon-laveur sur la pince afin que le liquide s'écoule de façon indirecte sur la grille ce qui évite d'abîmer les sections sur la grille. On laisse par la suite sécher les grilles sur du papier-filtre, les coupes sur le dessus. Une fois les grilles sèches,

on peut procéder à la coloration, afin de rendre les structures cellulaires plus denses aux électrons. On commence par la coloration à l'acétate d'uranyl et pour se faire, on dépose la grille sur une goutte de ce produit (10  $\mu$ L) pendant 5 minutes. On rince rapidement avec un jet d'eau bidistillée pendant 30 secondes et on sèche la grille sur du papier absorbant. Elle est alors prête pour son observation au microscope électronique. Si on veut un peu plus de contraste, on peut colorer la grille au plomb. Pour ce faire, on met la grille sur une goutte de solution de citrate de plomb pendant 1 minute puis on la rince au jet d'eau pendant 30 secondes. Il faut faire attention de ne pas faire sécher la grille avant le rinçage complet du plomb, sinon ce dernier risque de précipiter et cela causera des artéfacts sur les coupes. Les observations ont été faites avec un microscope électronique Philips EM410LS et les photos ont été prises avec des films Kodak (VWR, # 4489).

## 7. COMPTAGE CELLULAIRE

Expression de PSA-NCAM au cours du développement : Pour tous les stades évalués ainsi que pour les différentes régions, au moins deux lames de deux expériences différentes ont été comptabilisées. Pour chaque lame, cinq champs à 40X (objectif 40X et oculaires 10X) ont été comptés et le tout a été fait par deux observateurs différents. Nous avons compté le nombre de cellules PGP9.5 positives ainsi que le nombre de ces cellules qui étaient PSA-NCAM positives. Un rapport entre les deux nous a donné le pourcentage de neurones PSA-NCAM positifs versus le nombre total de neurones présents dans le champ d'observation. Expression de PSA-NCAM au cours de l'inflammation colique : La même méthode décrite ci-dessus a été appliquée lors du comptage cellulaire de cette expérience. Pour chacune des trois expériences, cinq champs sur chaque lame ont été comptabilisés. Toutefois, un seul observateur a fait les comptages. Ceux-ci ont été fait à 20X (objectif 20X et oculaire 10X) (l'immunofluorescence de préparation entières ne permettant pas une bonne résolution à 40X, à cause de l'épaisseur plus élevée du tissu).

L'utilisation de la technique de « whole-mount » s'avère utile lors des comptages cellulaires, puisqu'en étirant les plexus, les neurones forment plus

ou moins une monocouche. Ceci assure qu'un maximum de cellules soit compté et que très peu d'entre elles soient oubliées dans le comptage à cause d'une superposition et ce, tout en minimisant les risques de les compter plus d'une fois. <sup>63</sup>

## **8. ANALYSES STATISTIQUES**

Les analyses statistiques ont été générées en utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 3.0; GraphPad Software, San Diego, CA). L'homogénéité des variances a été vérifiée sur les divers comptages cellulaires effectués avec un test de Bartlett et l'exclusion de l'homogénéité s'est fait avec une probabilité de  $P < 0.05$ . Des analyses globales de variances ont également été effectuées (ANOVA) où une probabilité inférieure à 0.05 a été considérée comme significative. Lorsque ce test donnait des résultats significatifs, les différences entre les valeurs individuelles ont été vérifiées avec le test t de Student, les niveaux de probabilité inférieurs à 5% ont été considérés comme significatifs.

### **III. RÉSULTATS**

### III. RÉSULTATS

---

#### 1. Expression de PSA-NCAM et de NCAM au cours du développement du SNE

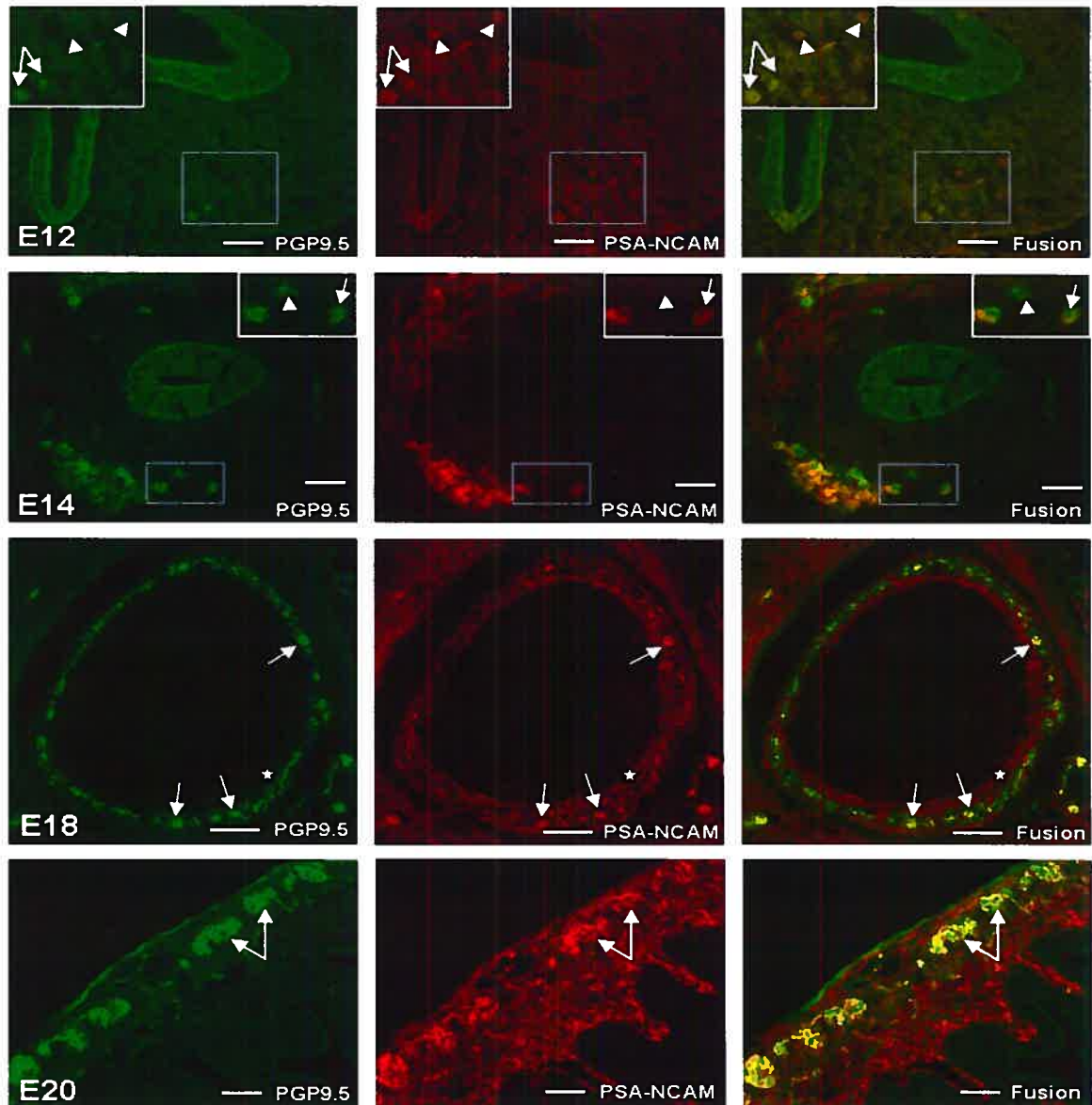
Pour déterminer le patron d'expression spatio-temporel de PSA-NCAM et de NCAM au cours du développement, l'immunomarquage de ces deux protéines dans l'intestin embryonnaire et foetal a été comparé. Les résultats sont présentés comme une série de figures représentatives des divers stades importants du développement du système nerveux entérique du rat. Les comptages cellulaires sont présentés sous forme de rapport, exprimé en pourcentage, entre le nombre de cellules PSA-NCAM positives et le nombre de neurones PGP9.5 positifs.

##### 1.1 L'expression de PSA-NCAM dans l'intestin augmente au cours du développement de l'embryon

Les cellules issues des crêtes neurales, les précurseurs des neurones et les cellules gliales entériques commencent à coloniser la paroi du tube digestif vers le dixième jour de gestation chez le rat.<sup>10</sup> Deux jours plus tard, soit à douze jours de gestation (E12), le tube digestif est presque colonisé en entier à l'exception des segments les plus distaux.<sup>122</sup> À ce stade, on détecte l'expression de PSA-NCAM à la surface de plusieurs neurones entériques. Une comparaison entre le marquage de PGP9.5 et de PSA-NCAM confirme que  $30,9 \% \pm 3,9 \%$  des neurones entériques expriment PSA-NCAM (figure 10 et 11). La présence de cellules négatives pour le marqueur neuronal PGP9.5, mais positives pour PSA-NCAM a également été observée (figure 10). À quatorze jours de gestation (E14), période à laquelle les ganglions entériques commencent à se former, les précurseurs neuronaux se placent graduellement en un anneau distinct sous la séreuse, localisation du futur plexus myentérique et on peut voir une couche indistincte de cellules musculaires circulaires.<sup>10, 82</sup> À ce stade du développement, un nombre plus important de neurones est

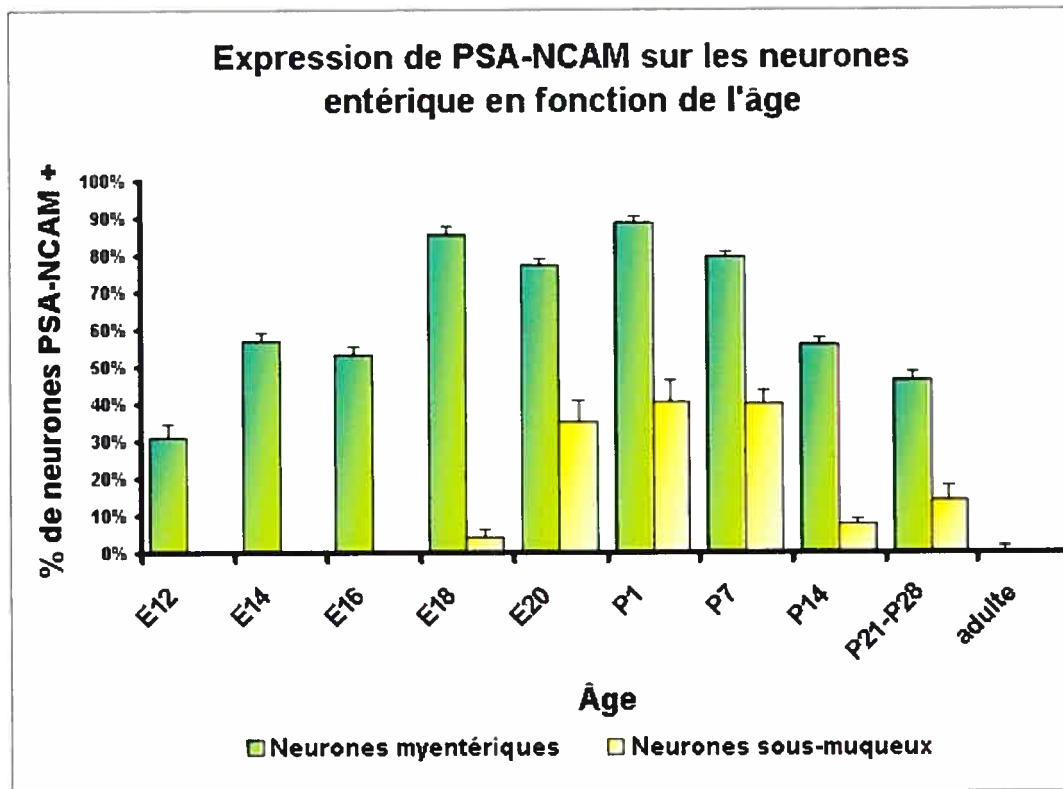
présent dans la paroi de l'intestin et ceux-ci expriment PSA-NCAM dans une proportion de  $56,9 \% \pm 2,2\%$  (figure 10 et 11). À E16, la forme polysialylée de NCAM continue d'être exprimée par  $53,4 \% \pm 2,1 \%$  des neurones. À dix-huit jours de gestation, les neurones entériques commencent à effectuer leur deuxième vague de migration afin de coloniser le plexus sous-muqueux.<sup>82</sup> À ce moment, la majorité ( $85,6 \% \pm 1,9 \%$ ) des neurones du plexus myentérique expriment PSA-NCAM (figure 10 et 11). Les neurones du plexus sous-muqueux, pour leur part, ne l'expriment que dans  $3,9 \% \pm 2,5 \%$  des cas. À E20, PSA-NCAM est exprimée par un peu plus du trois quart des neurones ( $77,1 \% \pm 1,8 \%$ ) ainsi que par près du tiers des neurones du plexus sous-muqueux ( $35,2 \% \pm 5,7 \%$ ) (figure 10 et 11).

À partir de E14 chez la souris, donc un peu plus tard chez le rat (vers E16), les cellules gliales entériques sont différenciées et celles-ci peuvent alors être visualisées avec l'anticorps anti-S100b.<sup>136</sup> Le double marquage de PSA-NCAM et de S100b ne permet pas de voir une co-localisation de ces deux protéines au cours du développement de l'embryon.



**Figure 10. L'expression de PSA-NCAM dans l'intestin augmente au cours du développement de l'embryon**

**E12:** Coupe transversale d'embryon, intestin proximal, l'encadré dans le coin supérieur est un agrandissement de la région sélectionnée; il y a une co-localisation de PSA-NCAM et de PGP9.5 sur quelques neurones (flèches) et il y a présence de cellules PGP9.5 négatives qui sont PSA-NCAM positives (têtes de flèches). **E14:** Coupe transversale d'embryon, œsophage, l'encadré dans le coin supérieur est un agrandissement de la région sélectionnée; la plupart des neurones expriment PSA-NCAM (flèches), mais pas tous (tête de flèche). **E18:** Coupe transversale d'embryon, intestin; la plupart des neurones expriment PSA-NCAM (flèches) ainsi que le mésenchyme (étoile), qui est PGP9.5 négatif. **E20:** Section longitudinale de jéjunum; la majorité des neurones du plexus myentérique (flèches) et sous-muqueux (tête de flèche) expriment PSA-NCAM. Échelle = 100  $\mu$ m.



**Figure 11. Expression de PSA-NCAM sur les neurones du SNE varie au cours du développement**

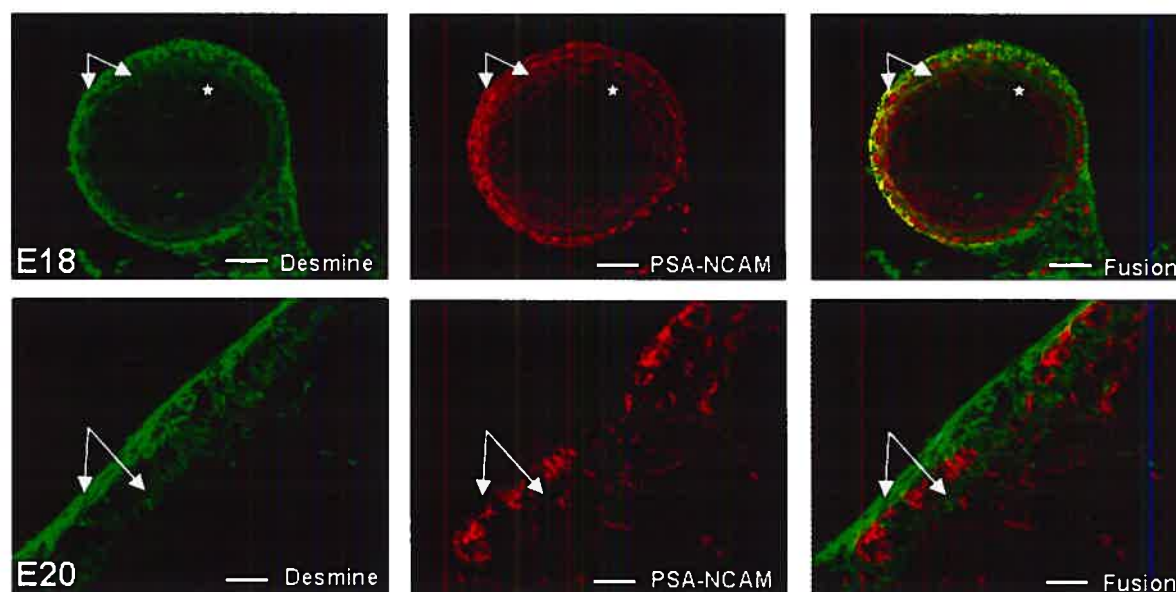
L'expression de PSA-NCAM, exprimée sous forme de pourcentage de neurones PSA-NCAM positifs versus le nombre total de neurones (cellules PGP9.5 positives) présents dans le champ d'observation, varie dans le temps et atteint un maximum d'expression durant la période périnatale puis devient quasiment nulle après le sevrage (P28 et plus).

## 1.2 Le mésenchyme et le muscle lisse expriment transitoirement PSA-NCAM chez l'embryon

Au douzième et quatorzième jour de gestation, on a pu voir que quelques cellules de l'épithélium expriment PSA-NCAM de même que les cellules du mésenchyme, les futures cellules musculaires. À E16, le mésenchyme demeure fortement positif pour PSA-NCAM et les cellules de la musculature lisse commencent elles aussi à exprimer la forme polysialylée de NCAM. En effet, les cellules présentes de part et d'autre du plexus myentérique, qui sont négatives pour PGP9.5, s'avèrent être positives pour



PSA-NCAM. Afin de confirmer nos observations, et s'assurer que ces cellules soient bel et bien des cellules musculaires, nous avons effectué des immunofluorescences doubles avec les anticorps anti-PSA-NCAM et anti-desmine, un marqueur du muscle lisse. Il y a en effet une co-localisation de ces deux marqueurs à ce stade du développement, et on dénote un marquage plus intense dans la couche musculaire lisse circulaire. À E18, le muscle lisse continue d'exprimer PSA-NCAM, expression confirmée avec sa co-localisation avec la desmine (figure 12). Au vingtième jour de gestation, l'expression de PSA-NCAM à la surface des cellules musculaires diminue, et ces dernières ne présentent quasiment plus d'immunoréactivité pour PSA-NCAM (figure 12). Dans l'intestin post-natal, la musculature lisse et le mésenchyme n'expriment plus la forme polysialylée de NCAM.



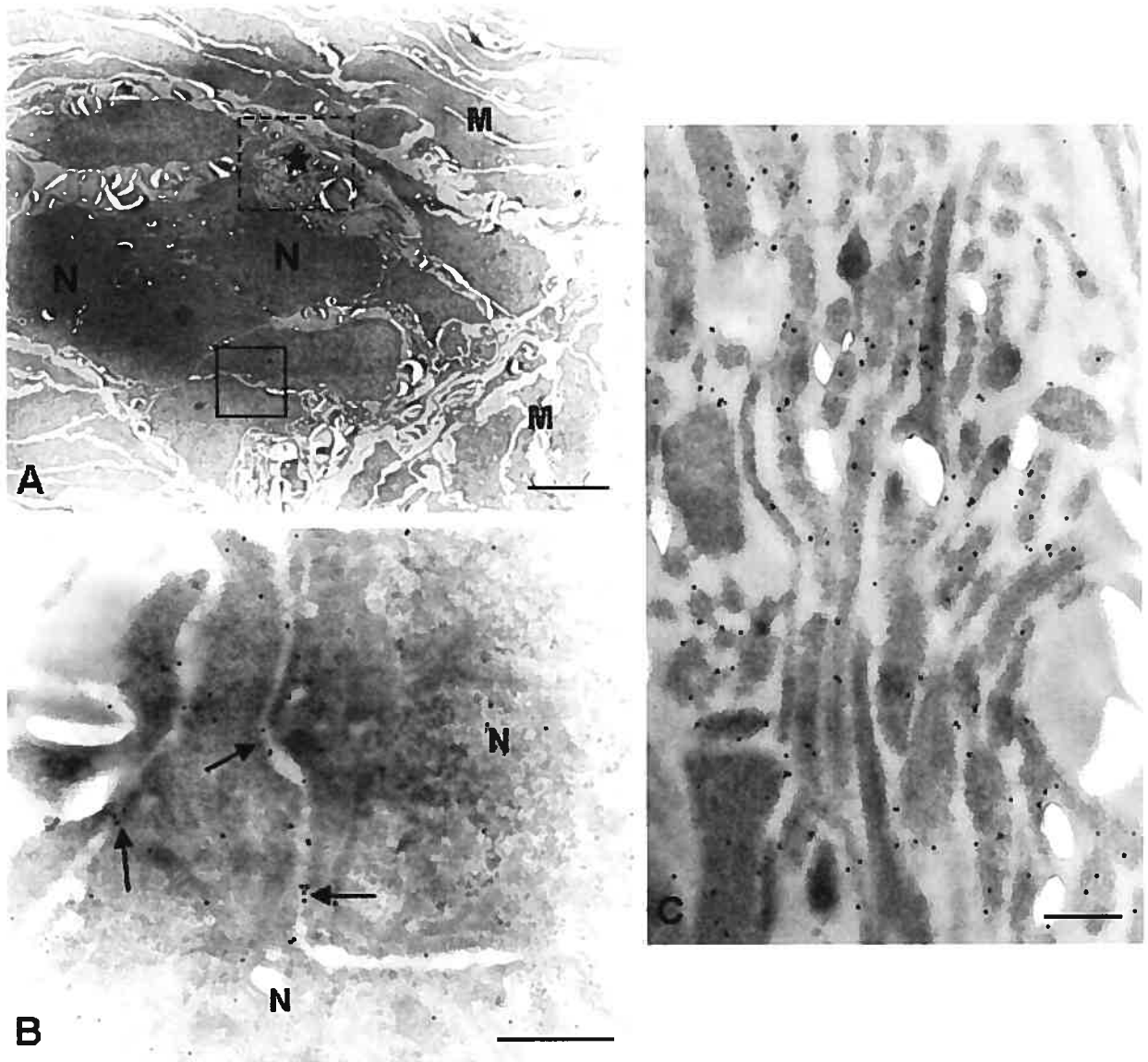
**Figure 12. Le muscle lisse exprime transitoirement PSA-NCAM chez l'embryon**

**E18:** Coupe transversale d'embryon, intestin; on observe une forte co-localisation entre le marqueur du muscle lisse, la desmine, et PSA-NCAM et ce, dans les deux couches de cellules musculaires (flèches); le mésenchyme est également positif pour PSA-NCAM (étoile). **E20:** Section longitudinale de jéjunum; à ce stade, la musculature lisse (circulaire et longitudinale) n'exprime presque plus PSA-NCAM (flèches). Échelle = 150  $\mu\text{m}$  pour E18 et 100  $\mu\text{m}$  pour E20.

### 1.3 L'expression de PSA-NCAM dans le système nerveux entérique diminue progressivement après la naissance

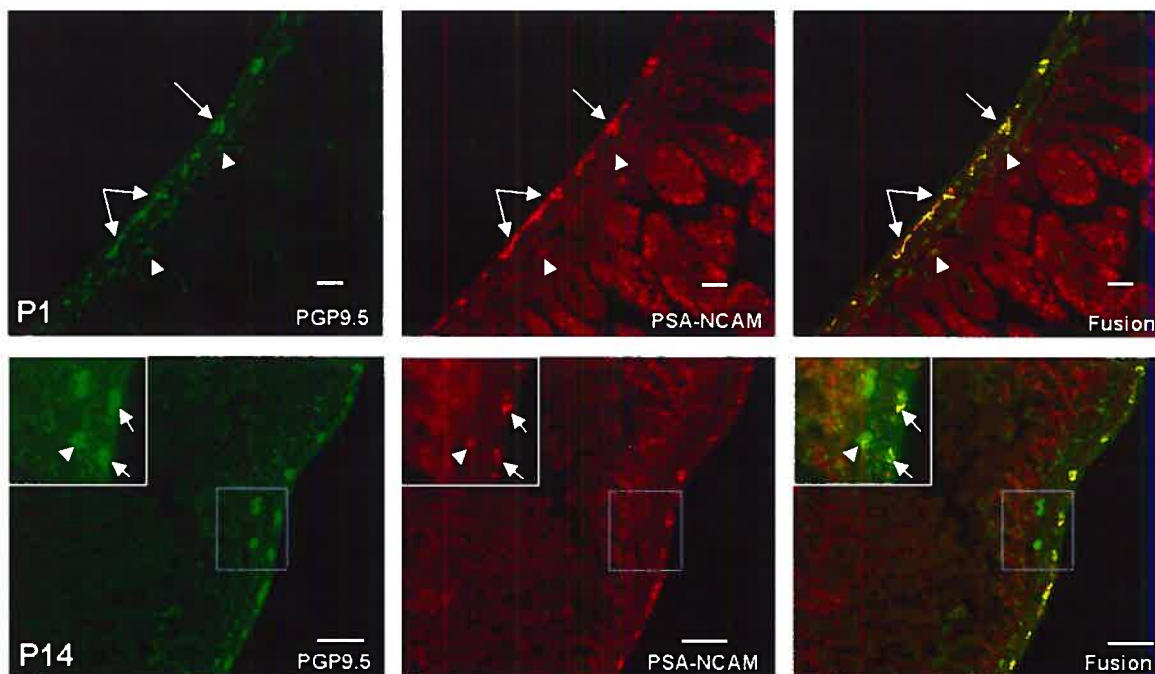
Lorsque les rats n'ont qu'un jour de vie (P1), les neurones entériques du plexus myentérique atteignent le maximum d'expression de PSA-NCAM (figure 11 et 14). En effet, ils sont marqués dans  $88,6 \% \pm 1,7 \%$  des cas. Les neurones du plexus sous-muqueux, pour leur part, atteignent également le maximum d'expression soit dans  $40,4 \% \pm 6,0 \%$  des cas. Au microscope électronique, l'immunocytochimie à l'or colloïdal nous a permis de localiser PSA-NCAM, comme l'on s'y attendait, sur la membrane cellulaire des neurones du plexus myentérique ainsi que sur les extensions neuritiques (figure 13 B et C). À P7, les neurones du plexus myentérique expriment toujours aussi fortement PSA-NCAM ( $79,5 \% \pm 1,4 \%$ ), tout comme les neurones du plexus sous-muqueux ( $40,4 \% \pm 3,7 \%$ ). Les extensions neuritiques expriment elles aussi PSA-NCAM à ce stade. Quatorze jours après la naissance, l'immunoréactivité de PSA-NCAM commence à diminuer dans le plexus sous-muqueux (figure 14). En effet, très peu de neurones dans ce plexus expriment encore cette protéine à ce stade du développement ( $7,5\% \pm 1,6 \%$ ), mais les extensions neuritiques conservent une assez bonne fluorescence (figure 11). Les neurones du plexus myentérique diminuent eux aussi progressivement leur expression de PSA-NCAM puisque que seulement  $56,1 \% \pm 1,5 \%$  d'entre eux continuent de l'exprimer (figure 11 et 14). Après le sevrage (entre P21-P28), les neurones et les neurites du plexus sous-muqueux sont maintenant négatifs, dans la majorité des cas, pour PSA-NCAM, à l'exception de quelques neurones dispersés qui conservent une certaine fluorescence ( $14,1 \% \pm 4,3 \%$ ) (figure 11 et 15). Les neurites du plexus myentériques demeurent pour leur part très positifs pour PSA-NCAM ainsi qu'une bonne partie des neurones de ce plexus ( $46,3 \% \pm 2,2 \%$ ) (figure 11). On note également, à certains endroits, la présence de cellules PGP9.5 négatives qui expriment PSA-NCAM (figure 15). L'immunofluorescence double avec le marqueur des cellules gliales ne révèle toutefois pas de co-localisation entre les deux. Un mois après la naissance, les

neurones du plexus myentérique et les neurites n'expriment pratiquement plus PSA-NCAM. Le marquage pour PSA-NCAM commence donc à diminuer, tout d'abord, à la surface des neurones, puis il diminue à la surface des neurites. Un double marquage avec PSA-NCAM et S100b ne révèle toujours pas de co-localisation entre la forme polysialylée de NCAM et ce marqueur des cellules gliales aux stades post-nataux. Chez l'adulte, de façon générale, les neurones, neurites et cellules gliales des plexus myentérique et sous-muqueux n'expriment plus PSA-NCAM (figure 15). Toutefois, à de rares endroits, on peut apercevoir une légère expression de la forme polysialylée de NCAM par certains neurones du plexus myentérique et parfois un faible marquage neuritique.



**Figure 13.** À P1, PSA-NCAM est localisé sur la membrane cytoplasmique des neurones ainsi que sur les extensions neuritiques

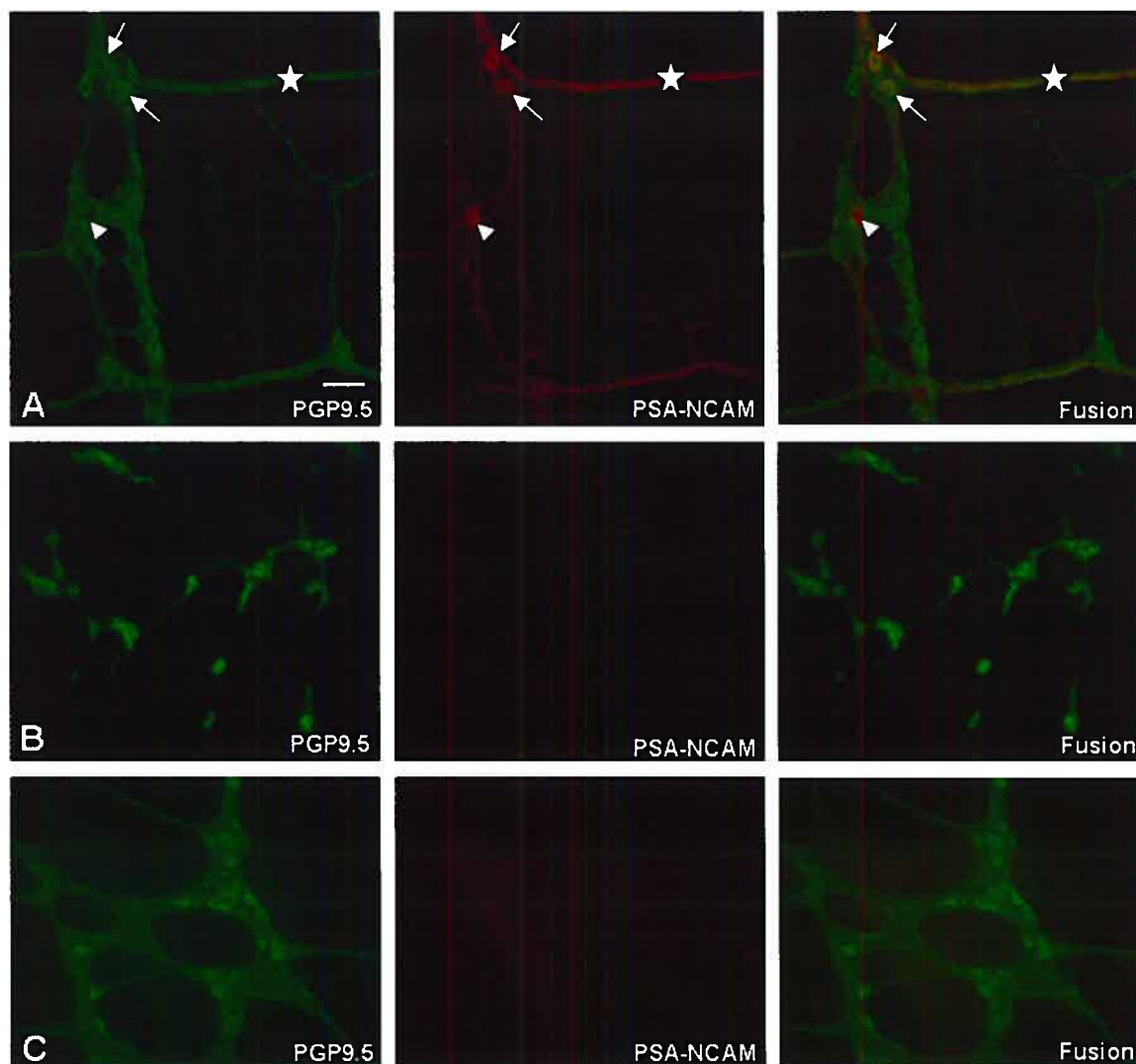
**A:** Coupe transversale, jéjunum; localisation à moindre grossissement d'un ganglion neuronal dans le plexus myentérique, au centre sont les neurones (N) constituant un plexus entérique et ce plexus est entouré de cellules musculaires (M). On distingue aussi un amas d'extensions neuritiques dans le haut du plexus (étoile). **B:** Coupe transversale, jéjunum, agrandissement de la région encadrée d'un trait plein; localisation de PSA-NCAM sur la membrane cellulaire des neurones (N), spécialement où les neurones se juxtaposent (flèches). **C:** coupe transversale, jéjunum, agrandissement de la région encadrée d'un trait pointillé; présence de grains d'or (PSA-NCAM) sur les extensions neuritiques des neurones entériques. Échelle = 10  $\mu\text{m}$  pour A, 0,5  $\mu\text{m}$  pour B et C.



**Figure 14. L'expression de PSA-NCAM commence à diminuer après la naissance**

**P1:** Section longitudinale d'iléon; maximum d'expression de PSA-NCAM par les neurones du plexus myentérique (flèches) et sous-muqueux (tête de flèches). **P14:** Section longitudinale d'iléon, l'encadré dans le coin supérieur est un agrandissement de la région sélectionnée; beaucoup de neurones du plexus myentérique expriment encore PSA-NCAM (flèches), tandis que dans le plexus sous-muqueux, que quelques rares neurones continuent encore de l'exprimer (tête de flèche). Échelle = 100  $\mu$ m.

À tous les stades de développement étudiés, l'analyse statistique n'indique aucune différence significative dans la proportion de neurones PSA-NCAM positifs entre les différents segments de l'intestin étudiés, soit entre le jéjunum, l'iléon et le côlon et ce, dans les deux plexus entériques.



**Figure 15. L'expression de PSA-NCAM diminue rapidement après le sevrage**

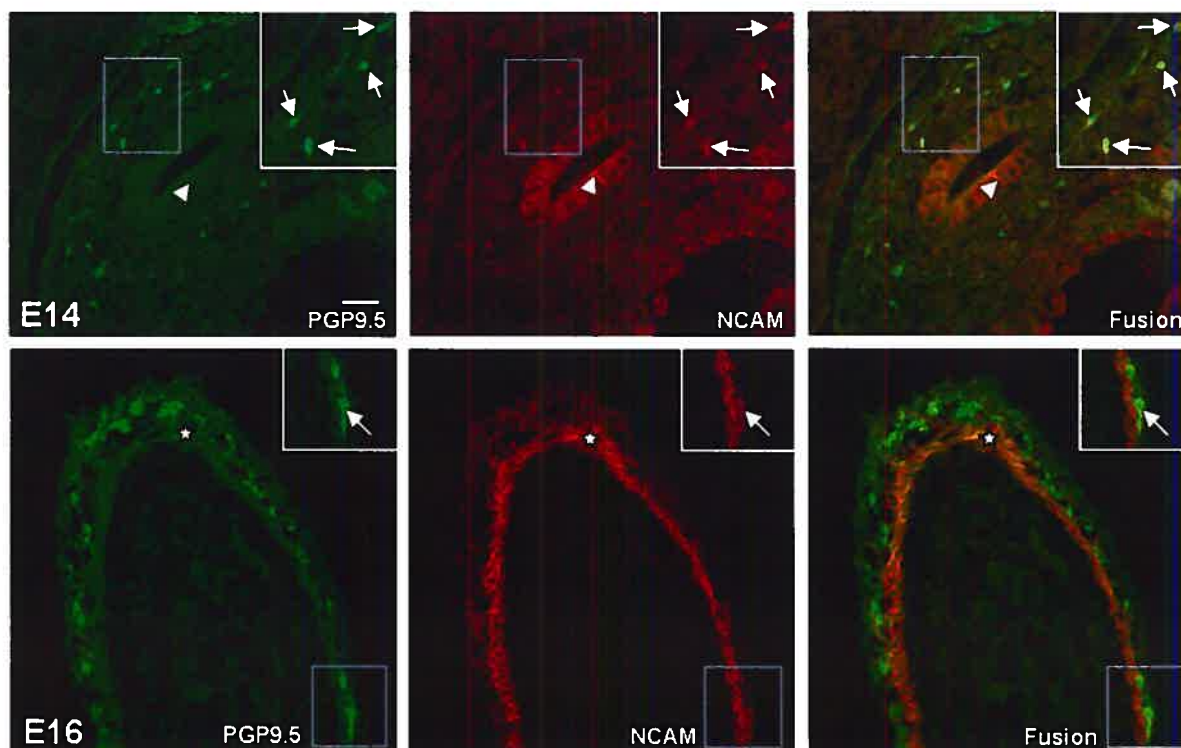
**A:** Préparation entière de plexus myentérique, jéjunum de rat sevré (P28); après le sevrage quelques neurones continuent d'exprimer PSA-NCAM (flèches) ainsi que quelques cellules PGP9.5 négatives (tête de flèches), les neurites demeurent très marqués (étoile). **B:** Préparation entière de plexus sous-muqueux, iléon de rat sevré (P28); aucune immunoréactivité de PSA-NCAM est détectée, tant sur les neurones que sur les neurites. **C:** Préparation entière de plexus myentérique, côlon de rat adulte; aucune immunoréactivité de PSA-NCAM n'est détectée à ce stade, ni sur les neurones ni sur les extensions neuritiques. Échelle = 50  $\mu$ m (s'applique à toutes les photos).

1.4 NCAM est exprimé sur les neurones et les cellules gliales entériques tant au cours du développement que chez l'adulte et est aussi exprimé transitoirement sur le muscle lisse chez l'embryon

Afin de vérifier que la perte de PSA-NCAM au cours du développement n'est pas attribuée à la perte de NCAM lui-même, nous avons aussi étudié l'expression de cette molécule d'adhésion cellulaire au cours du développement du système nerveux entérique. Chez l'embryon, il appert que les neurones entériques expriment NCAM, de même que les cellules du mésenchyme (figure 16). Au seizième jour de gestation, NCAM est aussi exprimé dans la musculature lisse (figure 16). À E18, on dénote une baisse de l'expression de NCAM à la surface des neurones, mais NCAM continue d'être très exprimé par les cellules musculaires longitudinales et circulaires ainsi que par les cellules du mésenchyme. À vingt jours de gestation, l'anticorps anti-NCAM marque de nouveau quelques neurones, mais marque avec beaucoup d'intensité les cellules musculaires. De la naissance jusqu'aux stades adultes, NCAM demeure exprimé par la majorité des neurones du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux ainsi que sur les neurites, mais ne l'est plus sur les cellules musculaires (figure 17).

Des immunofluorescences doubles avec le marqueur glial anti-S100b et le marqueur anti-NCAM montrent une forte co-localisation de ces deux protéines, prouvant ainsi que les cellules gliales des plexus entériques expriment elles aussi cette molécule d'adhésion. La co-localisation de NCAM et de S100b est observée à tous les stades post-natals (figure 17). Il est toutefois difficile de discerner si, dans les plexus entériques, le marquage de NCAM est plutôt glial ou neuronal. En effet, le marquage de NCAM se fait en périphérie des neurones, ce qui donne un marquage en couronne. Les fibres gliales quant à elles, forment un réseau interconnecté qui enveloppe plusieurs fois chaque neurone, de ce fait, si celles-ci expriment NCAM, le marquage se retrouvera lui aussi en périphérie des neurones.<sup>63</sup> La distinction entre un marquage glial périphérique et un marquage neuronal en couronne est donc assez difficile à faire. Toutefois, en regardant des zones négatives pour S100b et positives pour PGP9.5, on voit, dans la plupart des cas, un marquage de

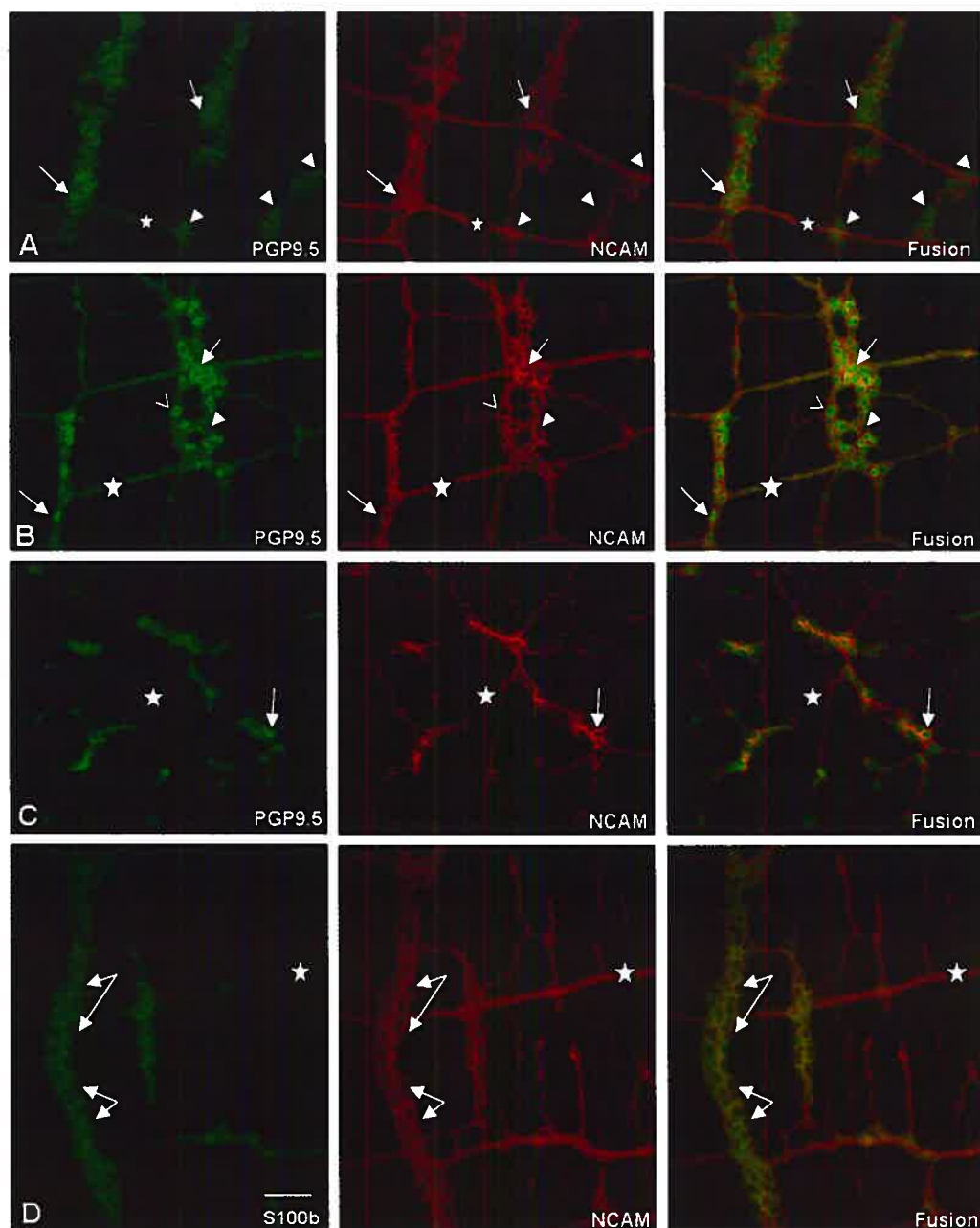
NCAM, confirmant que les neurones continuent d'exprimer cette molécule d'adhésion chez l'adulte. À l'inverse, des zones négatives pour PGP9.5, mais positives pour S100b, présentent elles aussi une immunoréactivité pour NCAM, ce qui indique que NCAM serait exprimé tant par les neurones que par les cellules gliales du système nerveux entérique mature (figure 17).



**Figure 16. NCAM est exprimé par les neurones, le mésenchyme et le muscle lisse chez l'embryon**

**E14:** Coupe transversale d'embryon, intestin, l'encadré dans le coin supérieur est un agrandissement de la région sélectionnée; la plupart des neurones expriment NCAM (flèches) ainsi que quelques cellules épithéliales (tête de flèches). **E16:** Coupe transversale d'embryon, intestin, l'encadré dans le coin supérieur est un agrandissement de la région sélectionnée; les neurones expriment NCAM (flèche), tout comme la musculature lisse qui l'exprime fortement (étoile). Échelle = 100  $\mu$ m (s'applique à toutes les photos).





**Figure 17. Aux stades postnatals, NCAM continue d'être exprimé par les neurones et les cellules gliales dans les deux plexus entériques**

**A:** Préparation entière de plexus myentérique, jéjunum P14; NCAM est exprimé par les neurones (flèches) et par les extensions neuritiques (étoile), on note aussi la présence de neurones NCAM négatifs (têtes de flèches). **B:** Préparation entière de plexus myentérique, jéjunum adulte; à ce stade, les neurones n'expriment plus PSA-NCAM, mais ils continuent d'exprimer NCAM (flèches), on note de nouveau la présence de neurones NCAM négatifs (tête de flèche vide) ainsi que la présence de zones NCAM positives, mais PGP9.5 négatives (tête de flèche pleine). **C:** Préparation entière de plexus sous-muqueux, iléon adulte; les neurones (flèche) et les neurites (étoile) du expriment NCAM. **D:** Préparation entière de plexus myentérique, iléon P28; les cellules gliales expriment fortement NCAM et on note la présence de zones S100b négatives, mais NCAM positives (flèches). Échelle = 50  $\mu\text{m}$  (s'applique à toutes les photos).

En somme, au cours du développement, on observe une augmentation graduelle de l'expression de PSA-NCAM à la surface des neurones du système nerveux entérique. Cette augmentation commence à E12 dans le plexus myentérique et à E18 dans le plexus sous-muqueux. Elle se poursuit jusqu'à la naissance où PSA-NCAM atteint son maximum d'expression tant dans le plexus myentérique que dans le plexus sous-muqueux. Passé ce stade, l'expression de PSA-NCAM commence à diminuer, d'abord dans les neurones du plexus sous-muqueux, où à P14 quelques neurones dispersés conservent une certaine expression. Puis c'est au tour des neurones du plexus myentérique de commencer à perdre leur fluorescence, celle-ci commence vers P14 et s'achève drastiquement après le sevrage. Les extensions neuritiques sont les dernières parties neuronales à perdre leur marquage pour PSA-NCAM et chez l'adulte, on peut considérer, malgré la persistance d'un faible marquage de PSA-NCAM sur quelques neurones, que le système nerveux entérique n'exprime plus la forme polysialylée de NCAM. L'immunofluorescence double de PSA-NCAM avec le marqueur glial S100b n'a pas révélée de co-localisation entre ces deux protéines. De ce fait, les cellules gliales entériques ne semblent pas exprimer PSA-NCAM. D'un autre côté, l'immunofluorescence double de PSA-NCAM et d'un marqueur du muscle lisse, l'anti-desmine, indique une expression transitoire de PSA-NCAM dans la musculature lisse circulaire et longitudinale aux stades embryonnaires E16, E18 et un peu à E20. L'étude de l'expression de NCAM nous a permis, quant à elle, d'observer un patron d'expression différent de celui de PSA-NCAM. Malgré un marquage neuronal, neuritique et musculaire similaire à celui de PSA-NCAM, il apparaît que NCAM est aussi exprimé par les cellules gliales du SNE. De plus, aux stades où PSA-NCAM n'est plus exprimé, NCAM continue de l'être autant à la surface des neurones qu'à la surface des cellules gliales.

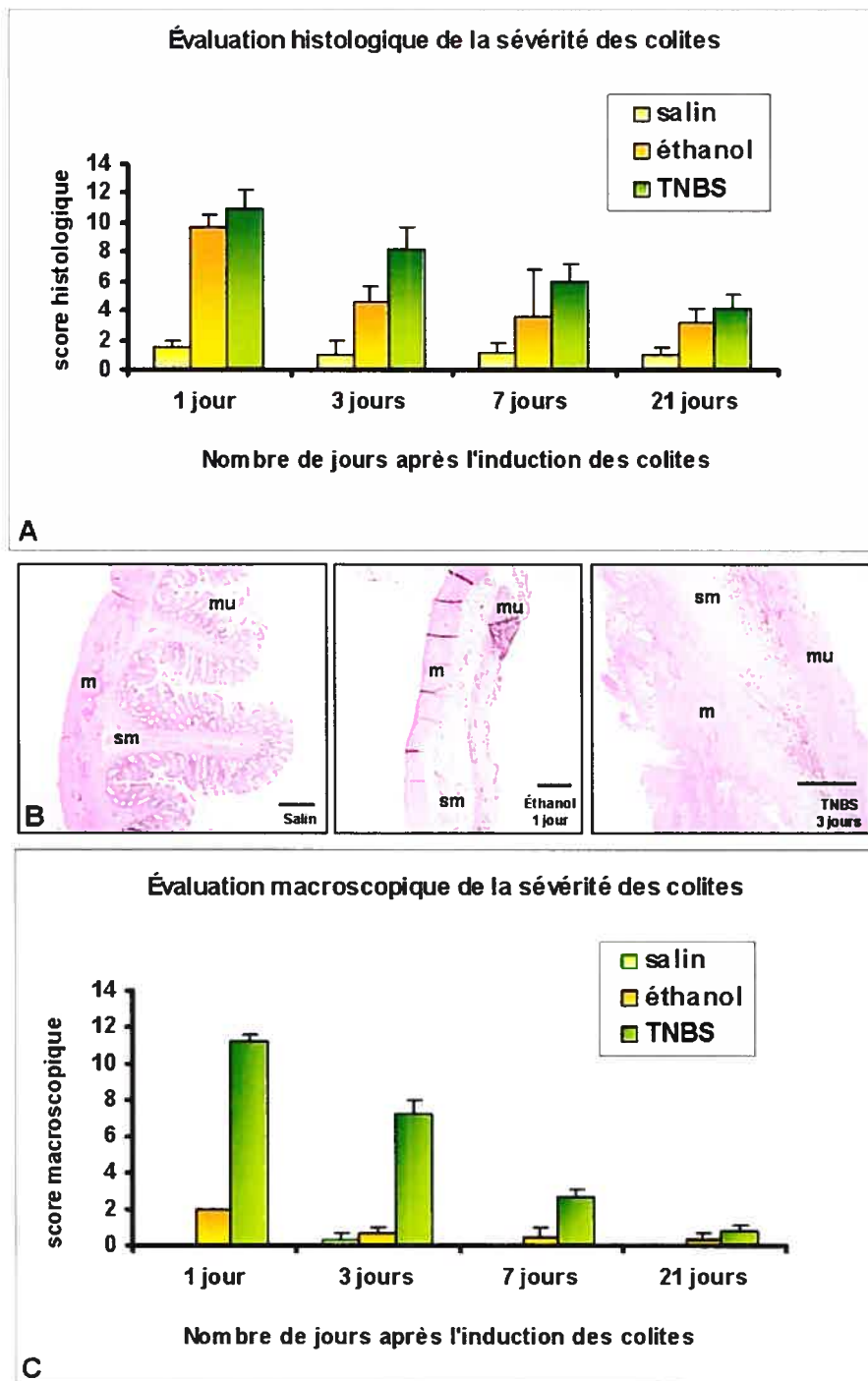
## 2. Expression de PSA-NCAM au cours de la réponse à l'inflammation colique

### 2.1 Les rats injectés avec une solution saline sont normaux et les neurones entériques n'expriment pas PSA-NCAM

Tous les rats injectés avec une solution saline sont asymptomatiques et à la dissection, aucun signe d'inflammation n'est détecté (score macroscopique moyen de 0,1) et ce, à tous les stades étudiés (1, 3, 7 et 21 jours après injection) (figure 18 b et c; 19 c). L'évaluation histologique, effectuée par un pathologiste, confirme une architecture normale de la paroi du côlon ainsi qu'une activité mucosécrétoire normale (score histologique moyen de 1,25) (figure 18 a). L'étude de l'expression de PSA-NCAM révèle qu'une proportion normale des neurones entériques exprime, pour ce stade, la forme polysialylée de NCAM ( $0,02 \% \pm 1,9\%$ ), soit une expression quasiment nulle (figure 20 a).

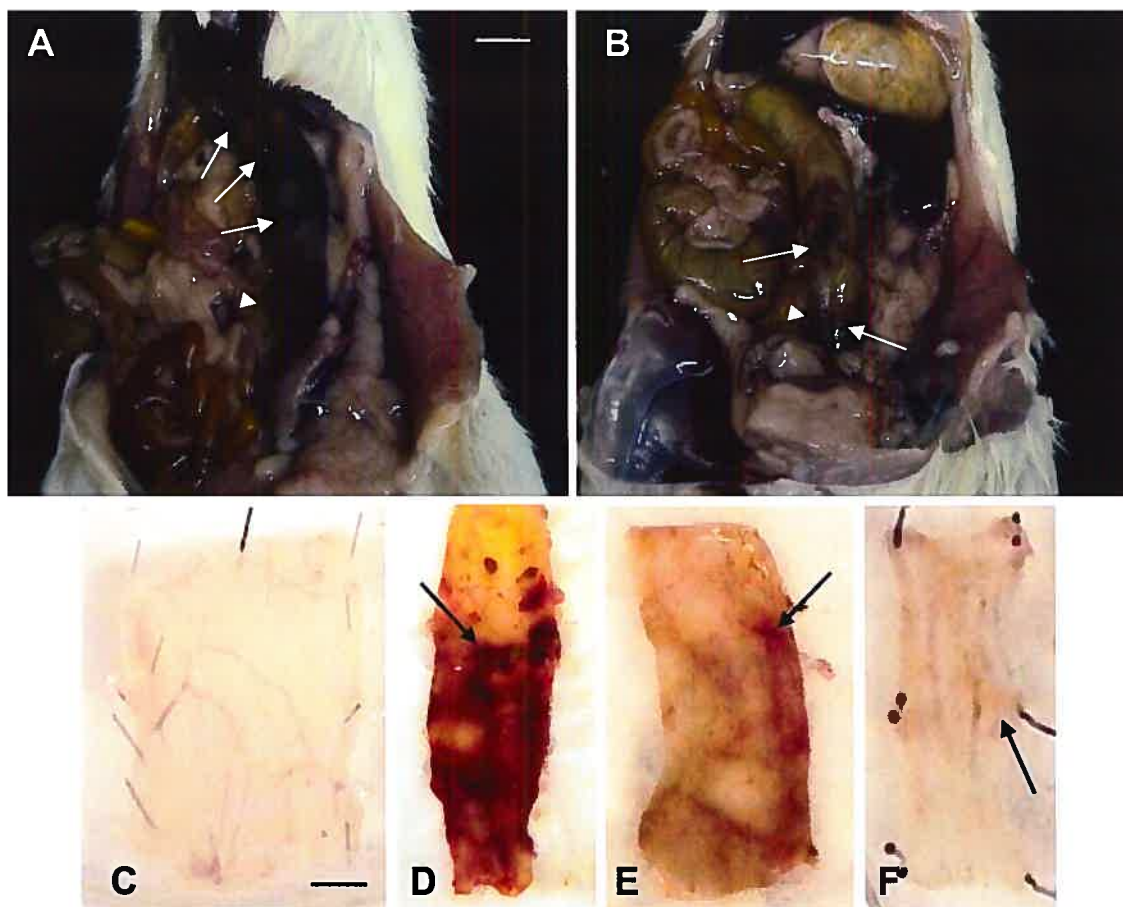
### 2.2 L'éthanol 50% cause de l'inflammation mais n'induit pas une réexpression significative de PSA-NCAM par les neurones entériques

À première vue, les rats injectés avec le solvant du TNBS, l'éthanol 50%, ne montrent pas de signes visibles de maladie et semblent bien portants au lendemain de l'injection. Toutefois, à la dissection, la région où la solution a été injectée (le côlon à 7 cm de l'anus) montre des signes d'inflammation: des rougeurs ainsi qu'un épaissement modéré de la paroi (score macroscopique de 2) (figure 18 c). L'examen histologique montre des dommages cellulaires plus importants que ce que l'on peut percevoir à l'œil nu. En effet, on dénote une nécrose hémorragique en cours de réépithélialisation avec une infiltration lymphocytaire jusque dans la couche sous-muqueuse (score histologique de 9,7) (figure 18 a). La région contrôle, le côlon proximal juste après le cæcum (sans inflammation), présente une apparence normale, que l'examen histologique confirme (score histologique de 0,5). Lors de l'étude de l'expression de PSA-NCAM, on observe une augmentation de l'expression de la protéine à la surface des neurones myentériques:  $1,1 \% \pm 0,62 \%$  des cellules



**Figure 18. L'injection de TNBS cause la destruction de la muqueuse et engendre une forte réaction inflammatoire**

**A:** Score histologique de la sévérité des colites. **B:** Coupe de côlon adulte normal et inflammé; l'éthanol et le TNBS cause une forte destruction de la muqueuse (mu) et induit l'infiltration des lymphocytes dans la sous-muqueuse (SM) ainsi qu'une hyperplasie du muscle (m). **C:** Score macroscopique de la sévérité des colites. Échelle = 175  $\mu$ m



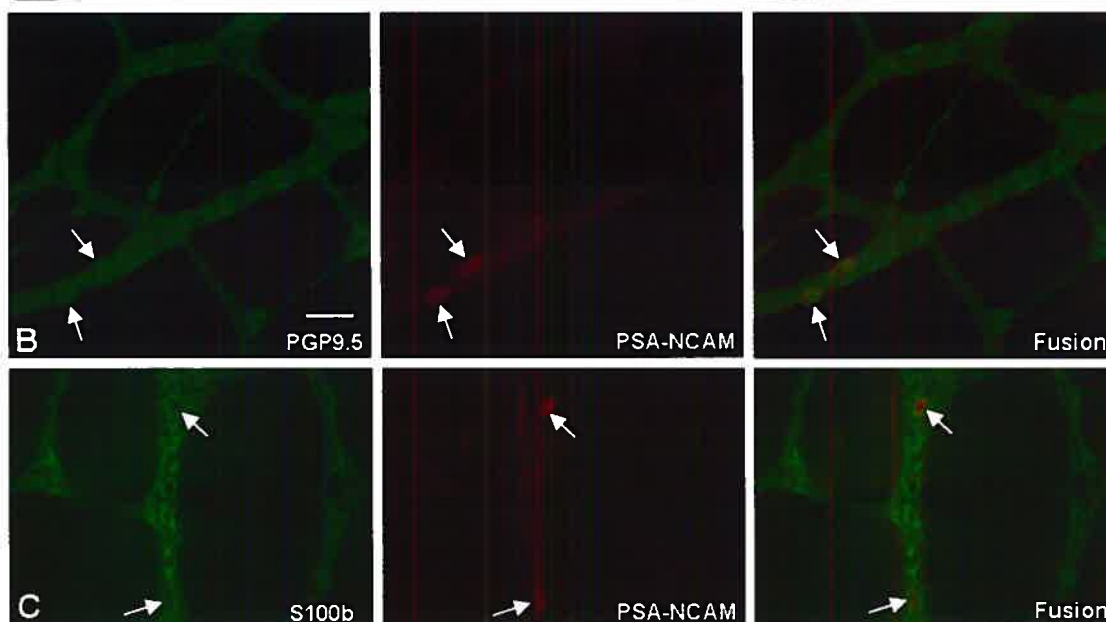
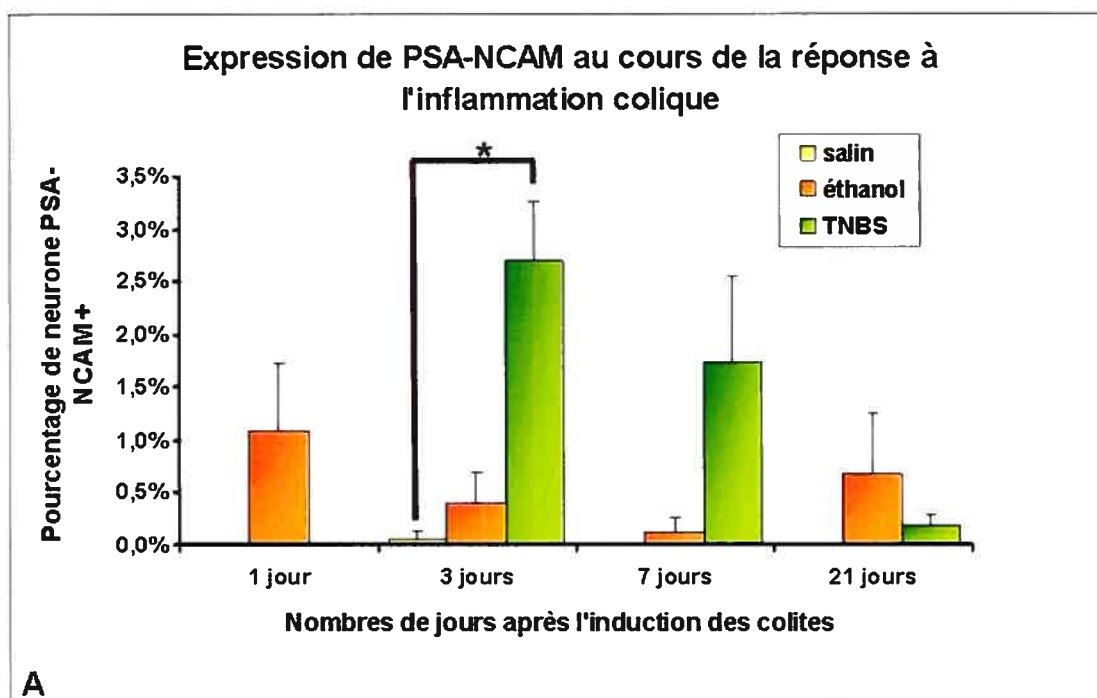
**Figure 19. Examen macroscopique de la sévérité des colites**

**A** : Côlon 1 jour après l'injection de TNBS; large plage des nécrose visibles lors de la dissection (flèche) ainsi qu'une infiltration graisseuse (tête de flèche). **B** : Côlon 3 jours après l'injection de TNBS; macroscopiquement moins enflammé qu'à 1 jour, mais tout de même présence de plages de nécrose (flèche) ainsi qu'une infiltration graisseuse encore détectable (tête de flèche). **C** : Côlon, ouvert le long de la bordure mésentérique, d'un rat injecté avec une solution saline; aucun signe d'inflammation n'est détectable. **D** : Côlon de rat, ouvert le long de la bordure mésentérique, 1 jour après l'injection de TNBS; on peut voir plus distinctement les plages de nécrose tissulaire causées par l'injection du produit irritant (flèche). **E** : Portion de côlon 3 jours après l'injection de TNBS; l'épithélium est déjà en cours de guérison, mais on détecte toujours des zones d'inflammation de la muqueuse (flèche). **F** : Côlon 7 jours après l'injection de TNBS; épithélium presque complètement guéri, présence de zones cicatricielles (flèche). Échelle = 1.5 cm (A et B) et 0.25 cm (C à F)

PGP9.5 positives expriment PSA-NCAM (figure 20 a). Malgré le fait que cette augmentation soit tout de même plus élevée que le taux basal d'expression de PSA-NCAM chez l'adulte normal ( $0,02 \% \pm 1,9\%$ ), celle-ci n'est toutefois pas significative. À trois jours après l'induction des colites, il n'y a pas beaucoup de signes d'inflammation à part quelques rougeurs dans la région d'intérêt (score macroscopique de 1) (figure 18 c). Du point de vue histologique par contre, on voit qu'il reste encore un peu d'infiltration lymphocytaire et que l'épithélium est en réparation (score histologique de 4,6) (figure 18 a). En ce qui concerne l'expression de PSA-NCAM,  $0,4\% \pm 0,29\%$  des neurones entériques continuent de l'exprimer, et cette expression n'est toujours pas significative (figure 20 a). À sept jours, les rats ne montrent que quelques rougeurs lors de la dissection (score macroscopique de 0,5) et lors de l'examen histologique, ce dernier révèle que l'épithélium demeure en phase de réparation (score histologique de 3,6) (figure 18 a et c). L'étude de l'expression de PSA-NCAM révèle que les neurones expriment PSA-NCAM de façon normale, c'est-à-dire que seulement  $0,13\% \pm 0,13\%$  des neurones expriment la protéine (figure 20 a). Il est à noter que l'erreur standard élevée est due au petit nombre d'échantillons disponibles dans cette catégorie. À vingt-et-un jours, les rats ne présentent plus de signes visibles d'inflammation suite à l'examen macroscopique (score de 0,3) (figure 18). L'examen histologique montre une mucosécrétion presque normale et mais parfois encore une hyperplasie de la *muscularis mucosa* (score histologique de 3,2). PSA-NCAM continue d'être exprimé à un niveau près de la normale par les neurones entériques ( $0,67\% \pm 0,59\%$ ) (figure 20 a).

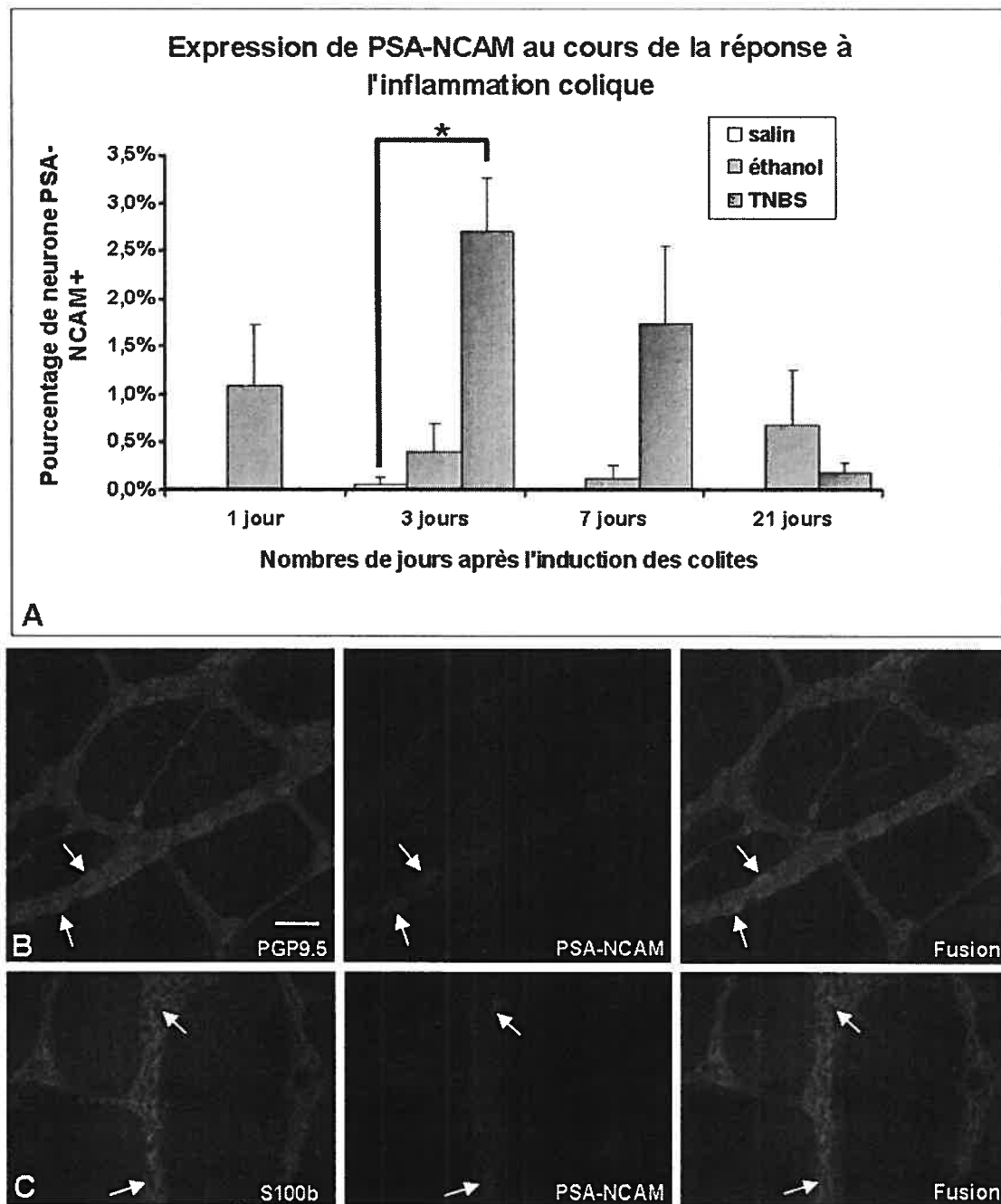
### 2.3 Le TNBS provoque une forte réponse inflammatoire et induit la réexpression transitoire de PSA-NCAM par les neurones entériques

Pour les rats injectés avec du TNBS, dans la majorité des cas, ceux-ci sont très malades le lendemain de l'induction des colites. Ils ont, pour la plupart, la diarrhée, des selles avec du sang, les poils humides (signe de fièvre) et l'anus irrité. À la dissection, on voit que la région d'intérêt est fortement enflammée,



**Figure 20. L'inflammation induite avec l'injection de TNBS cause une réexpression de PSA-NCAM à la surface des neurones myentériques 3 jours après l'induction des colites**

**A:** Pourcentage de neurones PSA-NCAM positifs aux divers stades d'évaluation des colites; à 3 jours expression significative (\*,  $p < 0,05$ ) de PSA-NCAM sur les neurones myentériques. **B:** Préparation entière de plexus myentérique, côlon TNBS à 3 jours; quelques neurones réexpriment PSA-NCAM (flèches). **C:** Préparation entière de plexus myentérique, côlon TNBS à 3 jours; il n'y a pas de réexpression de PSA-NCAM sur les cellules gliales (flèche). Échelle = 50  $\mu\text{m}$  (s'applique à toutes les photos).



**Figure 20. L'inflammation induite avec l'injection de TNBS cause une réexpression de PSA-NCAM à la surface des neurones myentériques 3 jours après l'induction des colites**

**A:** Pourcentage de neurones PSA-NCAM positifs aux divers stades d'évaluation des colites; à 3 jours expression significative (\*,  $p < 0,05$ ) de PSA-NCAM sur les neurones myentériques. **B:** Préparation entière de plexus myentérique, côlon TNBS à 3 jours; quelques neurones réexpriment PSA-NCAM (flèches). **C:** Préparation entière de plexus myentérique, côlon TNBS à 3 jours; il n'y a pas de réexpression de PSA-NCAM sur les cellules gliales (flèche). Échelle = 50  $\mu$ m (s'applique à toutes les photos).



qu'il y a présence d'infiltrations graisseuses ainsi qu'un épaissement de la paroi (score macroscopique de 11,2) (figure 18 c et 19 a et d). L'analyse histologique nous confirme les dommages que le TNBS a eu sur la paroi du côlon dans la région d'intérêt: ulcération jusque dans la sous-muqueuse, oedème, larges plages de nécrose hémorragique et inflammation aiguë de la muqueuse et de la sous-muqueuse avec une infiltration polymorphe dans toute la paroi (score histologique de 11) (figure 18 a). Malgré l'extrême inflammation, l'expression de PSA-NCAM n'est pas différente de celle qui est retrouvée dans le système nerveux entérique adulte normal et de ce fait, aucun des neurones comptés n'exprimaient PSA-NCAM (figure 20 a). La portion de côlon contrôle ne présente quant à elle aucun signe d'inflammation (score histologique de 1) et PSA-NCAM n'est pas exprimé par les neurones du plexus myentérique. Ceci confirme que l'inflammation induite par le TNBS n'est que locale. Trois jours après l'injection du TNBS, les rats ont l'air assez bien en général malgré le fait que certains d'entre eux aient encore la diarrhée. À la dissection, l'examen macroscopique révèle divers degrés d'inflammation. En effet, certains rats présentent de larges plages d'irritation, la présence d'adhérences et d'infiltration graisseuse (figure 19 b et e) tandis que dans d'autres, la paroi du côlon est presque guérie et ne présente que quelques rougeurs. Le score macroscopique moyen se situe donc à 7,2 (figure 18 c). L'examen histologique montre également une variation importante des dommages. Dans certains cas, la paroi a un aspect presque normal, et d'en d'autre on note encore la présence de larges plages de nécrose de la muqueuse et de la sous-muqueuse (score histologique de 8,2) (figure 18 a). À ce stade, toutefois, plusieurs neurones réexpriment PSA-NCAM. En effet, il y a une augmentation significative de l'expression de PSA-NCAM par les neurones du plexus myentérique lorsque celle-ci est comparée au taux d'expression normal de la protéine chez l'adulte. En effet,  $2.7 \% \pm 0.57 \%$  des neurones expriment PSA-NCAM, suite à l'injection de TNBS, contre seulement  $0.02 \% \pm 1.9\%$  chez l'adulte normal (figure 20 a). On dénote également la présence de quelques cellules non PGP9.5 qui expriment PSA-NCAM. Afin de vérifier si ces cellules sont des cellules gliales, nous avons fait un double marquage avec

S100b et ce dernier s'avère être négatif (figure 20 b et c). La morphologie de ces cellules ressemble par contre beaucoup à celle des neurones. À sept jours après l'induction des colites, les rats sont bien portants et à la dissection, la région d'intérêt est beaucoup moins enflammée et est en voie de guérison (score macroscopique de 2.6) (figure 18 c et 19 f). L'analyse histologique en vient aux mêmes conclusions: il y a présence de zones cicatricielles et de régénération (score histologique de 5.9) (figure 18 a). En ce qui concerne l'expression de PSA-NCAM, la protéine continue d'être exprimée par les neurones, mais à un niveau plus bas ( $1.74 \% \pm 0.81 \%$ ), qui ne s'avère toutefois pas être significatif (figure 20 a). À vingt-et-un jours, les rats ne présentent encore que quelques rougeurs lors de l'évaluation macroscopique (score de 0.7) et du point de vue histologique, on dénote que l'épithélium est en phase de réparation ainsi qu'une mucosécrétion quasiment revenue à la normale (score histologique de 4.2) (figure 18 a et c). L'étude de l'expression de PSA-NCAM révèle que le taux d'expression est redevenu près de celui des rats adultes normaux et PSA-NCAM n'est exprimé que par  $0.18 \% \pm 0,1\%$  des neurones du plexus myentérique (figure 20 a).

En somme, l'induction de colite avec du TNBS cause une forte destruction de l'architecture de la muqueuse, la déplétion des cellules de gobelet et de l'œdème muqueux et sous-muqueux et même le solvant du TNBS, l'éthanol 50%, cause des dommages non négligeables à l'intégrité de la paroi, causant lui aussi de l'inflammation. Toutefois, seule l'inflammation induite par le TNBS cause une réexpression significative de PSA-NCAM à la surface des neurones du plexus myentérique, trois jours après l'induction des colites. Cette réexpression n'est cependant que transitoire puisque qu'elle disparaît à sept jours post-injection.

## **IV. DISCUSSION**

## IV. DISCUSSION

---

Dans cette étude, nous avons examiné l'expression de PSA-NCAM dans le système nerveux entérique au cours du développement et, dans un deuxième temps, au cours de la réponse à l'inflammation chez l'adulte, afin d'explorer une piste possible de fonction pour PSA-NCAM dans le SNE.

### **L'expression de PSA-NCAM varie au cours du développement du SNE**

Les précurseurs dérivés des crêtes neurales commencent à coloniser l'intestin foetal vers le dixième jour de gestation chez le rat, mais ce n'est qu'à E12 que les neurones se différencient morphologiquement.<sup>10</sup> À ce stade, le tube digestif en développement est un épithélium rudimentaire entouré d'une dense couche de cellules mésenchymateuses et on peut voir les neurones dispersés à travers ces dernières. Chez l'embryon, nous avons observé l'expression de PSA-NCAM et de NCAM sur plusieurs neurones, cellules du mésenchyme et sur quelques cellules épithéliales. L'observation de NCAM sur ces cellules concorde avec des études précédentes, qui ont fait mention de sa présence dans le SNE ainsi que sur des structures dérivées du neuroectoderme et du mésoderme, comme la plaque neurale, le tube neural et les somites.<sup>2, 10, 11, 64, 84</sup> PSA-NCAM est aussi exprimé par quelques cellules qui sont négatives pour le marqueur neuronal PGP9.5. Celles-ci ne sont pas des cellules gliales puisqu'elles ne sont pas encore différenciées dans les plexus entériques à ce stade du développement, ne l'étant qu'au quatorzième jour de gestation chez la souris.<sup>136</sup> Puisque ces cellules ne sont ni des neurones ni des cellules gliales, il se pourrait qu'elles soient des précurseurs neuronaux ou gliaux non différenciés. Une immunofluorescence double avec le marqueur pour les cellules issues des crêtes neurales, p75, pourrait éventuellement clarifier la nature de ces cellules PSA-NCAM positives.

Contrairement à ce qu'on aurait pu s'attendre, très peu de neurones sous-muqueux expriment PSA-NCAM durant la migration de ceux-ci à partir du plexus myentérique (E18). En effet, PSA-NCAM étant associé avec la

diminution des propriétés adhésives de NCAM, il aurait été plausible d'observer que les neurones en migration expriment PSA-NCAM, mais cela ne semble pas être le cas. D'un autre côté, l'expression de NCAM par les neurones entériques à ce stade semble diminuer, ce qui porte à croire que durant la vague de migration des neurones du plexus myentérique vers le plexus sous-muqueux, l'adhésion des neurones soit atténuée par une diminution de l'expression de NCAM et non pas par l'ajout d'acide polysialique.

L'augmentation graduelle de l'expression de PSA-NCAM à la surface des neurones du système nerveux entérique se poursuit jusqu'à la naissance où PSA-NCAM atteint son maximum d'expression tant dans le plexus myentérique que dans le plexus sous-muqueux. Au microscope électronique, l'immunocytochimie à l'or colloïdal nous a permis de localiser PSA-NCAM, comme l'on s'y attendait, sur la membrane cellulaire des neurones du plexus myentérique ainsi que sur les neurites. Cette observation est en accord avec celle de la présence de PSA-NCAM le long de la membrane cytoplasmique des neurones et du cône de croissance, tôt durant le développement des neurones du cerveau.<sup>126</sup> Selon cette même étude, l'expression de PSA-NCAM se confine progressivement aux éléments pré- et post-synaptiques au fur et à mesure que les neurones deviennent plus matures morphologiquement.<sup>64, 87, 126</sup> La perte de PSA, associée à l'augmentation des propriétés adhésives de NCAM, contribue alors à la stabilisation des synapses.<sup>126</sup> Au cours de cette étude, nous n'avons pu que mettre au point le protocole d'immunocytochimie à l'or colloïdal pour PSA-NCAM dans des tissus intestinaux. De ce fait, une évaluation ultérieure plus détaillée de l'ultralocalisation de PSA-NCAM au cours du développement des neurones entériques nous permettrait de vérifier si la même relocalisation synaptique de PSA-NCAM peut être observée au cours de la maturation des neurones entériques.

Une semaine après la naissance, l'expression de PSA-NCAM commence à diminuer dans les neurones du plexus sous-muqueux, de sorte qu'à P14 seulement quelques neurones dispersés conservent une immunoréactivité pour PSA-NCAM. Les neurones du plexus myentérique commencent à perdre leur fluorescence vers P14 et celle-ci s'éteint

drastiquement après le sevrage (P21-P28). Les extensions neuritiques sont les dernières parties neuronales à perdre leur marquage pour PSA-NCAM, tant dans le plexus sous-muqueux que myentérique. À P28, la présence de quelques cellules PSA-NCAM positives non PGP9.5 et non S100b peut soulever quelques questions quant à leur nature (figure 15). Chez la souris, les anticorps PGP9.5 et S100b marquent, respectivement, tous les neurones et toutes les cellules gliales dans l'intestin adulte.<sup>136</sup> Toutefois, chez le rat, PGP9.5 ne marque que 80% des neurones myentériques.<sup>33</sup> La morphologie de ces cellules PSA-NCAM positives ressemblant beaucoup à celle d'un neurone, il est fort possible que ces cellules soient en effet des neurones, mais qu'ils fassent partie des 20% qui ne sont pas marqués par l'anticorps PGP9.5. L'utilisation d'un autre marqueur neuronal pourrait éventuellement confirmer la nature de ces cellules.

L'étude de l'expression de NCAM nous a permis d'observer un patron d'expression différent de celui de PSA-NCAM et ce, malgré un marquage neuronal, neuritique et musculaire similaire à celui de PSA-NCAM chez l'embryon. En effet, aux stades où PSA-NCAM n'est plus exprimé (chez l'adulte), NCAM continue de l'être de les deux plexus entériques. Cette observation est en accord avec une autre étude mentionnant la présence, chez l'adulte, de NCAM sur les ganglions du plexus myentérique, les neurites ainsi que sur les nerfs présents dans la musculature lisse.<sup>84</sup> Une étude des niveaux d'expression de NCAM et de PSA-NCAM dans la moelle épinière et dans le SNP en développement a déjà signalé un patron d'expression différent de ces deux protéines, suggérant que la polysialylation de NCAM est un processus régulé indépendamment de l'expression de NCAM lui-même.<sup>19</sup> De ce fait, il serait intéressant d'étudier aussi, par hybridation *in situ*, les patrons d'expression des deux enzymes polysialyltransférases STX et PST, responsables de l'attachement de PSA aux NCAM, et vérifier si ceux-ci correspondent à celui de PSA-NCAM au cours du développement du SNE.

Les interactions cellule-cellule, induites par les molécules d'adhésion cellulaire, jouent un rôle clé pendant l'embryogenèse en contrôlant les mouvements cellulaires, l'agrégation, la migration et la prolifération de même

que la différenciation cellulaire.<sup>11, 51, 104, 109, 134</sup> La formation de connexions synaptiques adéquates durant le développement dépend fortement de l'adhésion cellulaire.<sup>4, 14</sup> Le patron d'expression de PSA-NCAM dans le système nerveux embryonnaire est hautement dynamique et la forte glycosylation de NCAM diminue l'adhésion cellulaire ce qui facilite la recherche axonale, la migration cellulaire, la synaptogénèse ainsi que la formation du tissu musculaire.<sup>4, 13, 20, 22, 104</sup> Au cours de la maturation et de la différenciation, l'expression de PSA-NCAM diminue au profit de NCAM au fur et à mesure que le tissu adulte se forme.<sup>22</sup>

La forte polysialylation de NCAM observée durant l'embryogenèse du SNE ainsi que durant la période périnatale pourrait avoir une fonction similaire à celle dans le SNC en développement, en étant impliqué dans la formation et le remodelage des connexions synaptiques des neurones entériques. Aussi, le SNE demeure encore flexible chez le nouveau-né puisque le tractus gastro-intestinal doit s'adapter continuellement aux changements de longueurs de l'intestin.<sup>113</sup> De plus, la pleine maturité morphologique et fonctionnelle, ainsi que l'apparition des phénotypes neuronaux adultes, n'est pas atteinte à la naissance et la différenciation neurochimique du type adulte ne survient qu'après le sevrage chez le rat.<sup>38, 80</sup> Puisque le sevrage des nouveaux-nés ne se fait qu'entre les stades postnataux vingt-et-un et vingt-huit chez le rat, l'expression de PSA-NCAM à la surface des neurones durant toute la période du sevrage est donc en accord avec ces observations. La présence de PSA-NCAM pourrait alors caractériser l'immaturité des neurones et son expression dans les ganglions entériques, jusqu'à un mois après la naissance, pourrait indiquer un rôle pour la forme polysialylée de NCAM dans le remodelage postnatal du SNE.

### **PSA-NCAM et NCAM sont exprimés par le muscle lisse chez l'embryon**

Chez l'embryon, nous avons observé, en plus de l'expression de PSA-NCAM et NCAM sur les neurones myentériques, une expression musculaire de ces deux protéines. En effet, l'immunofluorescence double de PSA-NCAM avec un marqueur du muscle lisse, la desmine, indique une expression

transitoire de la forme polysialylée de NCAM dans la musculature lisse circulaire et longitudinale et ce, uniquement aux stades embryonnaires E16, E18 et un peu à E20. L'expression de PSA-NCAM sur la musculature lisse n'avait pas encore été décrite. Une étude antérieure a toutefois déjà décrit l'expression transitoire de la forme polysialylée de NCAM à la surface des myotubes lors de leurs séparation durant la morphogenèse du diaphragme et ce, pendant les deux phases de migration; une fois la séparation terminée, l'expression de PSA-NCAM diminue rapidement de la surface des myotubes.<sup>4</sup> Le rôle de PSA-NCAM durant cette phase de séparation, a été associé avec la séparation des membranes et la défasciculation des axones.<sup>4</sup>

Tout comme pour PSA-NCAM, des études antérieures ont déjà démontré que NCAM est exprimé transitoirement à la surface des myofibres squelettiques, cardiaques et lisses durant leur développement.<sup>4, 101, 102, 108</sup> En effet, NCAM est fortement exprimé sur toute la surface des cellules musculaires squelettiques avant leur innervation, après quoi son expression est réprimée et ne se restreint qu'à la jonction neuromusculaire.<sup>1</sup> NCAM est également exprimée de façon ponctuelle par la musculature lisse durant la phase tardive de l'embryogenèse ainsi que durant les stades périnataux.<sup>1</sup> À ce moment, les couches musculaires lisses n'ont pas atteint leur épaisseur maximale et les cellules musculaires sont donc encore en phase de prolifération.<sup>1</sup> On a noté que l'apparition de NCAM suit des patrons bien définis qui correspondent à ceux de la différenciation des couches musculaires de l'intestin : la couche musculaire lisse circulaire est la première à se différencier, puis survient la différenciation de la couche musculaire longitudinale ainsi que celle de la *muscularis mucosa*.<sup>102</sup>

Nos résultats confirment l'expression de PSA-NCAM au cours de la morphogenèse du muscle lisse dans l'intestin. Il appert, suite aux observations que nous avons faites et celles déjà décrites, que la présence de PSA-NCAM et de NCAM est importante pour la régulation des divers phénomènes liés à l'adhésion cellulaire lors de la morphogenèse du muscle lisse.



## **Les cellules gliales entériques n'expriment pas PSA-NCAM, mais expriment NCAM**

L'immunofluorescence double de PSA-NCAM avec le marqueur glial S100b n'a pas révélée de co-localisation entre ces deux protéines. De ce fait, les cellules gliales ne semblent pas exprimer PSA-NCAM au cours du développement du système nerveux entérique. L'étude de l'expression de NCAM nous a permis, quant à elle, d'observer son expression par les cellules gliales du SNE, le double marquage de NCAM et S100b permettant d'établir que les cellules gliales, morphologiquement identifiables, expriment NCAM. Ces observations sont confirmées par d'autres études qui ont déjà fait mention de son expression sur les cellules gliales.<sup>32, 84</sup> La distinction entre un marquage glial périphérique ou un marquage neuronal en couronne est toutefois assez difficile à faire et cette difficulté a déjà été soulevée dans une autre étude où la présence d'une immunoréactivité membranaire et cytoplasmique des neurones et des cellules gliales a été observée.<sup>84</sup> Par déduction, en regardant des zones négatives pour S100b et positives pour PGP9.5 et vice versa, on voit, dans la plupart des cas une immunoréactivité pour NCAM, ce qui laisse croire que NCAM serait exprimé tant par les neurones que par les cellules gliales du système nerveux entérique chez l'adulte. Mirsky et ses collaborateurs en sont venus à la même conclusion, c'est-à-dire que les patrons de marquage observés provenaient d'une combinaison de marquage neuronal et glial.<sup>84</sup> Afin de mieux clarifier ce point, la microscopie électronique, une technique de marquage plus précise que l'immunofluorescence en microscopie optique, pourrait éventuellement être d'une grande aide et permettre une meilleure distinction des deux types de marquages.

## **L'inflammation induite par l'injection intra rectale de TNBS induit une réexpression de PSA-NCAM sur une population de neurones myentériques**

La paroi du tube digestif contient une population résidente de cellules inflammatoires qui contribuent à un état physiologique basal d'inflammation.<sup>18</sup> Ceci est confirmé par l'examen histologique de la sévérité des colites, les rats salins présentant tout de même un taux minimal d'inflammation. L'inflammation gastro-intestinale, une fois déclenchée, induit une perturbation des patrons d'innervation et cause des réarrangements structuraux et fonctionnels.<sup>92</sup> L'inflammation intestinale entraîne aussi une augmentation de l'excitabilité des neurones et une prolifération des cellules gliales entériques ainsi que des changements dans leur morphologie.<sup>118</sup> En réponse à diverses insultes, incluant l'inflammation, une augmentation de l'expression de PSA-NCAM par les astrocytes et les neurites dans le cerveau adulte a également été observée.<sup>96</sup> L'augmentation de l'expression de PSA-NCAM à la surface des neurones et astrocytes au cours de la réparation tissulaire suite à un traumatisme semble être fonctionnellement corrélée à ce phénomène puisque la réparation est retardée lorsque l'on bloque immunologiquement PSA-NCAM.<sup>13</sup> Ce serait en sensibilisant les différents effecteurs de la réparation, les oligodendrocytes, aux divers signaux promouvant la migration cellulaire et permettant ainsi aux cellules réparatrices de se rendre à l'endroit lésé que PSA-NCAM jouerait un rôle lors de la réparation tissulaire.<sup>13</sup>

Dans cette optique, le fait que l'induction de colite avec du TNBS cause une réexpression significative de PSA-NCAM à la surface des neurones du plexus myentérique trois jours après l'induction des colites, permet de supposer que PSA-NCAM pourrait aussi jouer un rôle dans la réparation associée à la réponse inflammatoire dans le SNE.

Malgré le fait qu'un faible pourcentage de neurones réexpriment PSA-NCAM (2,7%), il serait toutefois suffisant pour avoir des effets notables sur la réponse du SNE à l'inflammation. En effet, certains types de neurones qui composent le SNE sont présents dans des proportions moindres, qui varient de moins de 1% à 2%, et ceux-ci ont tout de même beaucoup d'influence sur les

fonctions intestinales. C'est le cas des neurones moteurs inhibiteurs des muscles longitudinaux (sécrètent entre autre de l'oxyde nitrique et de l'ATP) qui sont présents dans une proportion d'environ 2% ainsi que des neurones intesto-fugaux, présents pour leur part dans une proportion de moins de 1% (sécrètent de la sérotonine et de l'acétylcholine).<sup>42, 52</sup>

Les neurones entériques possèdent plusieurs caractéristiques uniques qui leur confèrent une grande capacité d'adaptation et ils sont considérés comme ayant un haut degré de plasticité en réponse à l'inflammation.<sup>119</sup> Aussi, PSA-NCAM étant nécessaire durant le développement des circuits neuronaux et étant un modulateur important de la plasticité neuronale dans l'hippocampe chez l'adulte,<sup>21, 86, 104</sup> il est tentant de spéculer que la réexpression de PSA-NCAM pourrait être associée avec un remodelage des connections synaptiques dans le système nerveux entérique mature. La réexpression de PSA-NCAM à la surface de certains neurones, lors de la réponse inflammatoire, pourrait donc être un marqueur de cette plasticité neuronale, soit la capacité de ces cellules à changer leur morphologie et de s'adapter.

Des études ont également indiqué qu'une première colite infectieuse rend l'intestin plus sensible au stress en induisant des changements à long terme dans la fonction et le phénotype des neurones entériques (plasticité neuronale), ce qui mène à une réponse inflammatoire excessive lors d'un nouveau stress de même nature.<sup>18, 132</sup> De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'expression de PSA-NCAM suite à l'induction d'une seconde colite. En effet, on pourrait peut-être observer une réexpression plus importante de la forme polysialylée de NCAM.

L'étude de la réponse inflammatoire sur les souris mutantes pour NCAM ou pour PST pourrait aussi être fort utile pour clarifier le rôle de PSA-NCAM durant ce processus. En effet, même si ces souris ne présentent pas de troubles digestifs à prime abord, cela n'implique pas qu'elles ne peuvent en avoir au cours d'une situation pathologique, comme l'inflammation. Il serait donc fort intéressant d'évaluer les effets de la perte de l'expression de PSA-NCAM sur le processus de réparation tissulaire engendré lors de la réponse inflammatoire induite suite à l'injection d'un produit irritant comme le TNBS.

Il serait tout aussi intéressant d'examiner plus en détail le développement du SNE chez ces souris mutantes.

Le système immunitaire entérique établi aussi une mémoire à long terme des différentes menaces antigéniques rencontrées et certains facteurs neurotrophiques (GDNF, NT-3 et NGF) semblent être des joueurs importants dans l'établissement de cette « mémoire intestinale ». <sup>39</sup> Il se pourrait que PSA-NCAM, durant la réponse inflammatoire, puisse aussi jouer un rôle dans l'établissement de cette mémoire intestinale. La présence de PSA-NCAM pourrait sensibiliser les neurones à l'action de certains facteurs de croissance et permettre ainsi de moduler des changements dans la morphologie des neurones, un peu comme le fait PSA-NCAM pour BDNF dans le SNC. En effet, le rôle modulateur de PSA sur BDNF est important durant le développement et la plasticité postnatale du cerveau. <sup>64</sup> Il se pourrait bien que le potentiel de plasticité d'une synapse puisse être influencé par son degré d'adhésivité de la membrane synaptique à cause des capacités signalétiques de NCAM. <sup>102</sup> La présence de PSA pourrait donc créer une ouverture afin que la cellule puisse mieux répondre aux signaux externes appropriés. <sup>109</sup>

## **V. CONCLUSION**

## V. Conclusion

---

Le principal objectif de cette étude fut d'examiner l'expression de PSA-NCAM durant les divers stades de développement dans un modèle mammalien du SNE. Il appert, suite à cette étude, que PSA-NCAM est hautement exprimé par les neurones entériques tout au long du développement du système nerveux entérique et que son expression diminue une fois que les patrons d'innervation mature ont été atteints. Puisque le SNE est constamment exposé à une variété d'insultes mécaniques et chimiques, la question de plasticité et de régénérescence est assez pertinente.<sup>54</sup> Le plexus myentérique possède une habileté considérable de régénérescence et de plasticité et la réexpression de PSA-NCAM au cours de la réponse inflammatoire soutient l'idée selon laquelle la présence de cette protéine est associée à une forme de plasticité impliquée dans le processus de réparation tissulaire. Le rôle de PSA-NCAM dans le remodelage structural des connexions synaptiques dans le SNC demeurent encore nébuleux et requiert des recherches éventuelles afin d'évaluer la fonction exacte de PSA-NCAM dans la plasticité neuronale. De ce fait, le rôle de PSA-NCAM dans le SNE est donc loin d'être élucidé puisque les études de PSA-NCAM dans le SNE sont pratiquement absentes à ce jour. Il est certain toutefois que l'étude de pathologies du SNE chez les souris mutantes pour NCAM et pour PST pourrait éventuellement nous permettre de mieux définir le rôle de PSA-NCAM dans le SNE.

Malgré d'intenses années de recherches, plusieurs aspects fonctionnels du SNE demeurent encore non illucidés, mais durant les dernières années notre compréhension du SNE a grandement augmentée et il devient maintenant clair que le SNE possède la capacité de se modifier, se régénérer et effectuer des changements à long terme de ses fonctions synaptiques. Puisque le SNE postnatal demeure dans une certaine mesure assez plastique, il serait possible de retrouver un groupe de cellules souches chez l'humain adulte.<sup>8</sup> Récemment, on a en effet découvert la présence de cellules souches dérivées des crêtes neurales dans l'intestin adulte qui se renouvellent en culture et qui peuvent produire plusieurs types de cellules gliales et de neurones.<sup>54, 68</sup> La persistance

de ces cellules souches issues des crêtes neurales ouvre la porte à plein de possibilités pour la régénérescence suite à une blessure ou une maladie. <sup>68</sup> Par exemple, le seul traitement connu à ce jour pour la maladie de Hirschsprung est l'ablation des régions aganglionnaires, technique qui comporte certains risques et qui ne donne pas toujours les résultats les plus optimaux; une alternative à la chirurgie serait donc de reconstruire un SNE par la transplantation de cellules neuronales souches. <sup>18, 47, 131</sup> L'expression de PSA-NCAM à la surface des neurones entériques adultes pourrait peut-être caractériser une population de neurones immatures et plastiques. Une mise en culture de ceux-ci pourrait peut-être, éventuellement, mener à un traitement alternatif pour les maladies intestinales telles que la maladie de Hirschsprung.

## REMERCIEMENTS

---

Je remercie mon directeur de recherche Dr Christophe Faure de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir cru que je pouvais développer les aptitudes nécessaires à la réussite de ce projet.

Je remercie mon co-directeur Dr Moïse Bendayan ainsi que tous les membres de son laboratoire pour l'aide précieuse qu'ils m'ont offerte concernant la microscopie électronique.

Je remercie Dorothée Dal Soglio pour son aide et son expertise lors de l'évaluation histologique de la sévérité des colites.

Je remercie aussi le Dr Lionel Carmant pour nous avoir permis d'utiliser le microscope à fluorescence.

Enfin, je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour évaluer mon mémoire.



## RÉFÉRENCES

---

1. Akeson RA, Wujek JR, Roe S et al. Smooth muscle cells transiently express NCAM. *Mol Brain Res.* 1988; 464: 107-120.
2. Akitaya T and Bronner-Fraser M. Expression of cell adhesion molecules during initiation and cessation of neural crest cell migration. *Dev Dyn.* 1992; 194: 12-20.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular biology of the cell* 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science. 2002; 1463 pages.
4. Allan DW and Greer JJ. Polysialylated NCAM expression during motor axon outgrowth and myogenesis in the fetal rat. *J Comp Neurol.* 1998; 391: 275-292.
5. Alvarez-Buylla A. Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Cell Dev Biol.* 1997; 8: 207-213.
6. Angata K and Fukuda M. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie.* 2003; 85: 195-206.
7. Angata K, Long JM, Bukalo O et al. Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behaviour. *J Biol Chem.* 2004; 279: 32603-32613.
8. Angata K, Nakayama J, Fredette B et al. Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1997; 272: 7182-7190.
9. Aoki E, Semba R, Mikoshiba K et al. Predominant localization in glial cells of free L-arginine. *Brain Res.* 1991; 547: 190-192.
10. Baetge G, Pintar JE and Gershon MD. Transiently catecholaminergic (TC) cells in the bowel of the fetal rat: precursors of noncatecholaminergic enteric neurons. *Dev Biol.* 1990; 141: 353-380.
11. Bally-Cuif L, Goridis C and Santoni MJ. The mouse NCAM gene displays a biphasic expression pattern during neural tube development. *Development.* 1993; 117: 543-552.
12. Bär KJ, Facer P, Williams NS et al. Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology.* 1997; 112: 1381-1385.

13. Barral-Moran MJ, Calaora V, Vutskits L et al. Oligodendrocyte progenitor migration in response to injury of glial monolayers requires the polysialic neural cell-adhesion molecule. *J Neurosci Res.* 2003; 72: 679-690.
14. Beggs HE, Baragona SC, Hemperly JJ et al. NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125<sup>FAK</sup> and the SRC-related tyrosine kinase p59<sup>lyn</sup>. *J Biol Chem.* 1997; 272: 8310-8319.
15. Bendayan M. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Histochem Cytochem.* 1995; 29: 1-159.
16. Bendayan M. Worth its weight in gold. *Science.* 2001; 291: 1363-1365.
17. Ben-Hur T, Rogister B, Murray K et al. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci.* 1998; 18: 5777-5788.
18. Boeckxstaens, GE. Understanding and controlling the enteric nervous system. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002; 16: 1013-1023.
19. Boisseau S, Nedelec J, Poirier V et al. Analysis of high PSA N-CAM expression during mammalian spinal cord and peripheral nervous system development. *Development.* 1991; 112: 69-82.
20. Bonfanti L, Olive S, Poulain DA et al. Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience.* 1992; 49: 419-436.
21. Bouzioukh F, Tell F, Rougon G et al. Dual effects of NMDA receptor activation on polysialylated neural cell adhesion molecule expression during brainstem postnatal development. *Eur J Neurosci.* 2001; 14: 1194-1202.
22. Brusès JL and Rutishauser U. Roles, regulation and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie.* 2001; 83: 635-643.
23. Cabarrocas J, Savidge TC and Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia.* 2003; 41: 81-93.
24. Cataldo AM and Broadwell RD. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphate activity under normal and experimental conditions: I, neurons and glia. *J Electron Microsc.* 1986; Tech 3: 413-437.
25. Chalazonitis A. Neurotrophin-3 as an essential signal for the developing nervous system. *Mol. Neurobiol.* 1996; 12: 39-53.

26. Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J et al. Neurotrophin-3 induces neural crest-derived cells from fetal gut to develop in vitro as neurons or glia. *J Neurosci.* 1994; 14: 6571-6584.
27. Charter NW, Mahal LK, Koshland DE et al. Differential effects of unnatural sialic acid on the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and neuronal behavior. *J Biol Chem.* 2002; 277: 9255-9261.
28. Cooke HJ. Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1994; 266: G167-G178.
29. Costa M and Brookes SJH. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: S129-S136.
30. Cremer H, Lange R, Christoph A et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature.* 1994; 367: 455-459.
31. Crossin KL and Krushel LA. Cellular signaling by neural crest cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn.* 2000; 218: 260-279.
32. DiFiglia M, Marshall P, Covault J et al. Ultrastructural localization of molecular subtypes of immunoreactive neural cell adhesion molecule (NCAM) in the adult rodent striatum. *J Neurosci.* 1989; 9: 4158-4168.
33. Eaker EY and Sallustio JE. The distribution of novel intermediate filament proteins defines subpopulations of myenteric neurons in rat intestine. *Gastroenterology.* 1994; 107: 666-674.
34. Eaker EY, Sallustio JE, Harris JM et al. Myenteric plexus neurons have developmentally acquired differences in the medium molecular weight subunit of neurofilament protein. *Neuroscience.* 1993; 53: 561-570.
35. Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G et al. Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2000; 20: 5234-5244.
36. Eddleston M and Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes-implication for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993; 54: 15-36.
37. Esteban I, Levanti B, Garcia-Suarez O et al. A neuronal subpopulation in the mammalian enteric nervous system expresses TrkA and TrkC neurotrophin receptor-like proteins. *Anat Rec.* 1998; 251: 360-370.

38. Faussonne-Pellegrini MS, Matini P and Stach W. Differentiation of enteric plexus and interstitial cells of Cajal in the rat gut during pre- and postnatal life. *Acta Anat.* 1996; 155: 113-125.
39. Flaming G, Engele J, Geerling I et al. Neurotrophin and GDNF expression increases in rat adrenal glands during experimental colitis. *Neuroendocrinol Lett.* 2001; 22: 461-466.
40. Frieling T, Cooke HJ and Wood JD. Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon. *Am J Physiol.* 1993; 264: G74-G80.
41. Fu M, Tam PKH, Sham MH et al. Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat Embryol.* 2004; 208: 33-41.
42. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81: 87-96.
43. Furness JB, Clerc N and Kunze WAAA. Memory in the enteric nervous system. *Gut.* 2000; Suppl IV: iv60-iv62.
44. Gabella G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat.* 1971; 109: 81-95.
45. Garipey CE. Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. *Pediatr Res.* 2001; 49: 605-613.
46. Gershon MD. Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7: 101-109.
47. Gershon MD. Lessons from genetically engineered animal models II. Disorders of the enteric neuronal development : insights from transgenic mice. *Am J Physiol.* 1999; 277: G262-267.
48. Gershon MD and Rothman TP. Enteric glia. *Glia.* 1991; 4: 195-204.
49. Gomez TM and Spitzer NC. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transient. *Nature.* 1999; 397: 350-355.
50. Goyal RK and Hirano I. The enteric nervous system. *New Engl J Med.* 1996; 334: 1106-1115.
51. Graham KW, Liang JJ, Flores G et al. Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Mol Brain Res.* 1997; 51: 69-81.
52. Grider JR. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307: 460-467.

53. Guyton AC. Textbook of medical physiology 8<sup>th</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1991; 1014 pages.
54. Hanani M, Ledder O, Yutkin V et al. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J Comp Neurol.* 2003; 462: 315-327.
55. Hansen MB. The enteric nervous system I: Organisation and classification. *Pharmacol Toxicol.* 2003; 92: 105-113.
56. Hildebrandt H, Becker C, Murau M et al. Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem.* 1998; 71: 2339-2348.
57. Hoehner JC, Wester T, Pahlman S et al. Localisation of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology.* 1996; 110: 756-767.
58. Hollenbach E, Rühl A, Zoller M et al. T cell activation by enteric glia: a novel pathway for the amplification of inflammatory responses in the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 2000; 118: A184.
59. Huaming S, Watanabe M, Tomaszewicz H et al. Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci.* 1997; 17: 5221-5229.
60. Jacobson M. Developmental neurology 3<sup>rd</sup> edition. New York: Plenum Press. 1991; 776 pages.
61. Johnson LR, Alpers DH, Christensen J et al. Physiology of the gastrointestinal tract vol.1 3<sup>rd</sup> edition. New York : Raven Press. 1994; 1024 pages.
62. Kapur RP. Neuropathology of pediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J Pathol.* 2001; 194: 277-288.
63. Karaosmanoglu T, Aygun B, Wade PR et al. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: An evaluation of markers used to count neurons. *Anat Rec.* 1996; 244: 470-480.
64. Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z et al. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Rev.* 2001; 36: 175-184.
65. Kojima N, Kono M, Yoshida Y et al. Biosynthesis and expression of polysialic acid on the neural cell adhesion molecule is predominantly directed by ST8Sia II/STX during *in vivo* neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 1996; 271: 22058-22062.

66. Kolkova K, Novitskaya V, Pedersen N et al. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci.* 2000; 20: 2238-2246.
67. Komuro T, Baluk P and Burnstock G. An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience.* 1982; 7: 1797-1806.
68. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S et al. Neural crest stem cells persists in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron.* 2002; 35: 657-669.
69. Krushel LA, Tai MH, Cunningham BA et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signalling pathways involved in the inhibition of astrocytes proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 2592-2596.
70. Le Douarin NM and Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1973; 30: 31-48.
71. Lewin GR and Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996; 19: 289-317.
72. Li ZS, Pham TD, Tamir H et al. Enteric dopaminergic neurons: Definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci.* 2004; 24: 1330-1339.
73. Lucini C, de Girolamo P, Maruccio L et al. Trk-neurotrophin receptor-like immunoreactivity in the gut of teleost species. *Cell Tissue Res.* 1999; 296: 323-330.
74. Lucini C, Marruccio L, de Girolamo et al. Localisation of neurotrophin-containing cells in higher vertebrate intestine. *Anat Embryol.* 2002; 205: 135-140.
75. MacQueen G, Marshall J, Perdue M et al. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science.* 1989; 243: 83-85.
76. Mahal LK, Charter NW, Angata K et al. A small-molecule modulator of poly- $\alpha$ 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells. *Science.* 2001; 294: 380-381.
77. Maire YM et Lambert R. *Physiologie humaine: La digestion.* Villeurbanne : Simep-Éditions. 1976; 320 pages.

78. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines 2e édition. Montréal: Éditions du renouveau pédagogique. 1999; 1194 pages.
79. Massaro AR. The role of NCAM in remyelination. *Neurol Sci.* 2002; 22: 429-435.
80. Matini P, Mayer B and Fausone-Pellegrini MS. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res.* 1997; 288: 11-23.
81. McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E et al. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut.* 1999; 45: 864-873.
82. McKeown SJ, Chow CW and Young HM. Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.* 2001; 303: 301-305.
83. Mileusnic R, Lancashire C and Rose SPR. Sequence-specific impairment of memory formation by NCAM antisense oligonucleotides. *Learn Memory.* 1999; 6: 120-127.
84. Mirsky R, Jessen KR, Schachner M et al. Distribution of the adhesion molecules N-CAM and L1 on peripheral neurons and glia in adult rats. *J Neurocytol.* 1986; 15: 799-815.
85. Moreno-Flores MT, Dfaz-Nido J, Wandosell F et al. Olfactory ensheathing glia: drivers and axonal regeneration in the central nervous system. *J Biomed Biotechnol.* 2002; 2: 37-43.
86. Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P et al. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 4315-4320.
87. Muller D, Wang C, Skibo G et al. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron.* 1996; 17: 413-422.
88. Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V et al. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development.* 2002; 129: 5151-5160.
89. Ness TJ and Gebhart GF. Acute inflammation differentially alters the activity of two classes of rat spinal visceral nociceptive neurons. *Neurosci Lett.* 2000; 281: 131-134.

90. Newgreen D and Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbance part 1. *Pediatr Dev Pathol.* 2002; 5: 224-247.
91. Newgreen DF and Hartley L. Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and *spotting lethal* rat embryos. *Acta Anat.* 1995; 154: 243-260.
92. Palmer JM, Wong-Riley M and Sharkey KA. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in nematode-infected guinea pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998; 275: G922-G935.
93. Paratcha G and Ledda F. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell.* 2003; 113: 867-879.
94. Paxinos G. The human nervous system. Australia: Academic Press. 1990; 1195 pages.
95. Peters RJ, Osinski MA, Hongo JA et al. GDNF is abundant in the adult rat gut. *J Auton Nerv Syst.* 1998; 70: 115-122.
96. Philips GR, Krushel LA and Crossin KL. Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Dev Brain Res.* 1997; 102: 143-155.
97. Piccinini M, Merighi A, Bruno R et al. Affinity purification and characterization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) from retina. *J Biochem.* 1996; 318: 711-716.
98. Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V et al. Intracellular signalling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochem Res.* 2003; 28: 127-141.
99. Probstmeier R, Biltz A and Schneider-Schaulies J. Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid during early mouse embryogenesis. *J Neurosci Res.* 1994; 37: 324-335.
100. Roberts DJ. Embryology of the gastrointestinal tract. and Natarajan D and Pachnis V. Development of the enteric nervous system. In: Sanderson IR and Walker A, eds. The development of the gastrointestinal tract. London: B.C. Decker. 1999; 324 pages.
101. Romanska HM, Bishop AE, Brereton RJ et al. Increased expression of molecular cell adhesion molecule in congenital aganglionosis. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1104-1109.



102. Romanska HM, Bishop AE, Moscoso G et al. Neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in nerves and muscle of developing human large bowel. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996; 22: 351-358.
103. Ronn LCB, Berezin V and Bock E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci.* 2000; 18: 193-199.
104. Ronn LCB, Hartz BP and Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol.* 1998; 33: 853-864.
105. Rossi J, Luukko K, Poteryaev D et al. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR $\alpha$ 2, a functional neurturin receptor. *Neuron.* 1999; 22: 243-252.
106. Rougon G, Dubois C, Buckley N et al. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol.* 1986; 103: 2429-2437.
107. Rühl A, Franzke S and Stremmel W. IL-1 $\beta$  and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol Motil.* 2001; 13: 89-94.
108. Rutishauser U. Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. *Nature.* 1984; 310: 549-554.
109. Rutishauser U and Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 1996; 19: 422-427.
110. Saarma M and Sariola H. Other neurotrophic factors: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Techniq.* 1999; 45: 292-302.
111. Sariola H and Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 2003; 116: 3855-3862.
112. Schäfer KH, Saffrey MJ, Burnstock G et al. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Protoc.* 1997; 1: 109-113.
113. Schäffer KH, Hänsgen A and Mestres P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec.* 1999; 256: 20-28.

114. Schmid RS, Graff RD, Schaller MD et al. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol.* 1999; 38: 542-558.
115. Seidenfaden R, Gerardy-Schahn R and Hildebrandt H. Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. *Eur J Cell Biol.* 2000; 79: 680-688.
116. Sernka T and Jacobson ED. *Gastrointestinal physiology – the essentials* 2<sup>nd</sup> edition. Baltimore: Williams and Wilkins. 1983; 174 pages.
117. Sethi AK and Sama SK. Colonic motor activity in acute colitis in conscious dogs. *Gastroenterology.* 1991; 100: 954-963.
118. Sharkey KA and Kroese ABA. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system : Neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec.* 2001; 262: 79-90.
119. Stead RH. Nerve remodelling during intestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 1992; 664: 443-455.
120. Sternini C, Su D, Arakawa J et al. Cellular localization of Pan-trk immunoreactivity and TrkC mRNA in the enteric nervous system. *J Comp Neurol.* 1996; 368: 597-607.
121. Tamura K and Wood JD. Effects of prolonged exposure to histamine on guinea pig intestinal neurons. *Dig Dis Sci.* 1992; 37: 1084-1088.
122. Taraviras S and Pachnis V. Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9: 321-327.
123. Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P et al. Signalling by the Ret receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development.* 1999; 126: 2785-2797.
124. Tomasiewicz H, Ono K, Yee D et al. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron.* 1993; 11: 1163-1174.
125. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J et al. Lipid rafts in neuronal signalling and function. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 412-416.
126. Uryu K, Butler AK and Chesselet MF. Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *J Comp Neurol.* 1999; 405: 216-232.

127. Von Boyen GBT, Reinshagen M, Steinkamp M et al. Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors. *J Gastroenterol.* 2002; 37: 583-588.
128. Wester T, O'Briain DS and Puri P. Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. *Gut.* 1999; 44: 666-674.
129. Williams PL, Warnick R, Dyson M et al. *Gray's Anatomy* 37<sup>th</sup> edition. London: Churchill Livingstone. 1989; 1598 pages.
130. Wood JD. Communication between minibrain in gut and enteric immune system. *NIPS.* 1991; 3: 64-69.
131. Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology.* 2004; 127: 635-657.
132. Wood JD, Alpers DH and Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut.* 1999; 45: II6-II16.
133. Xia Y, Hu HZ, Liu S et al. IL-1beta and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1309-1316.
134. Yoneda A, Wang Y, O'Briain DS et al. Cell-adhesion molecules and fibroblast growth factor signalling in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2001; 17: 299-303.
135. Young HM and Newgreen D. Enteric neural crest-derived cells: Origin, identification. Migration and differentiation. *Anat Rec.* 2001; 262: 1-15.
136. Young HM, Bergner AJ and Müller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol.* 2003; 456: 1-11.
137. Young HM, Ciampoli D, Hsuan J et al. Expression of Ret-, p75<sup>NTR</sup>-, Phox2a-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn.* 1999; 216: 137-152.
138. Young HM, Hearn CJ, Farlie PG et al. GDNF is a chemo attractant for enteric neural cells. *Dev Biol.* 2001; 229: 503-516.
139. Young HM, Jones BR and McKeown SJ. The projections of early enteric neurons are influenced by the direction of neural crest cell migration. *J Neurosci.* 2002; 22: 6005-6018.