

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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.

Université de Montréal

**La plasticité du système nerveux entérique
au cours de l'inflammation: Réexpression
de PSA-NCAM dans un modèle de colite
expérimentale chez le rat adulte**

Par

Philippe Ouellet

Département de sciences biomédicales

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 sciences biomédicales

Août, 2007

© Philippe Ouellet, 2007



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La plasticité du système nerveux entérique
au cours de l'inflammation: Réexpression
de PSA-NCAM dans un modèle de colite
expérimentale chez le rat adulte**

Présenté par :

Philippe Ouellet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Fernando Alvarez, MD
président-rapporteur

Christophe Faure, MD
directeur de recherche

Mickael Bouin, MD
membre du jury

Résumé

Cette étude vise à vérifier si une colite induite chez le rat adulte par l'acide trinitrobenzoïque (TNBS) provoque une réexpression de la molécule d'adhésion neuronale polysialylée (PSA-NCAM) dans le système nerveux entérique (SNE). De plus, elle vise à déterminer dans quelle sous-population neuronale cette réexpression a lieu et quantifier la variation dans l'expression des transcrits des enzymes de régulation de PSA-NCAM : PST et STX.

La colite a été induite par l'injection intra-colonique de TNBS (20 mg). Les animaux contrôles ont été injectés avec de l'éthanol (50%) ou de la saline. Les côlons ont été récoltés 3, 7 et 21 jours suivant l'injection (T3, T7 et T21). La sévérité de la colite a été évaluée macroscopiquement (Macro, max=14) et histologiquement (Histo, max=13). Des immunofluorescences doubles ont été réalisées sur des préparations entières. Des marqueurs pour les neurones [PGP9.5], les neurones excitateurs [ChAT] et inhibiteurs [nNOS] et les neurones afférents primaires intrinsèques (*IPANs*) [calbindine] ont été utilisés en combinaison avec un anticorps contre PSA-NCAM. La PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour quantifier l'expression des transcrits de PST et STX. Au moins trois expériences ont été effectuées dans chacun des groupes.

Une colite sévère a été observée à T3 (Macro=10.6, Histo=8.9). À T3, 2.2%±0.3 ($p < 0.0001$ vs saline) des neurones PGP9.5+ réexprimaient PSA-NCAM. 92%±2 et 86%±2 des cellules PSA-NCAM+ sont respectivement calbindin+ et ChAT+. Aucune variation significative dans l'expression de l'ARNm des enzymes régulatrices de PSA-NCAM n'a été observée.

PSA-NCAM est réexprimée dans les cellules *IPANs* du plexus myentérique suite à une colite induite par le TNBS chez le rat adulte. La réexpression de PSA-NCAM dans le SNE pourrait faire partie des mécanismes préservant l'activité des réflexes intrinsèques au cours de la colite.

Mots clés : Système nerveux entérique, plasticité, PSA-NCAM, colite, *intrinsic primary afferent neurons*

Abstract

This investigation was undertaken to verify if trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis was associated with a reexpression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the adult rat enteric nervous system (ENS). Furthermore this research examined which cell population reexpressed PSA-NCAM and if this reexpression was associated with a variation in the mRNA expression of PST and STX: PSA-NCAM regulating enzymes.

Colitis was induced by intra-colonic administration of TNBS (20 mg). Control animals were injected with vehicle (50% ethanol) or saline. Colons were collected 3, 7 and 21 days after injection (T3, T7 and T21). Specimens were assessed for macroscopic (Macro, max=14) and histological (Histo, max=13) severity of colitis. Double immunofluorescences were performed on wholemount preparations. Markers for neurons [PGP9.5], excitatory [ChAT] and inhibitory [nNOS] neurons, and intrinsic primary afferent neurons (IPANs) [calbindin] were used in combination with an antibody for PSA-NCAM. Quantitative real-time PCR was performed. At least 3 experiments were performed in each experimental group.

Severe colonic inflammation was present at T3 (Macro=10.6, Histo=8.9). At T3, 2.2%±0.3 ($p<0.0001$ vs. saline) of the PGP9.5+ neurons reexpressed PSA-NCAM. 92%±2 and 86%±2 of PSA-NCAM+ cells were calbindin+ and ChAT+, respectively. No significant variation in PST and STX mRNA expression was observed at any stage.

PSA-NCAM is reexpressed in IPANs of the myenteric plexus following TNBS-induced colitis in the adult rat. PSA-NCAM reexpression in sensory neurons may be part of mechanisms that enhance intrinsic sensory reflex activity during intestinal inflammation.

Keywords: Enteric nervous system, plasticity, colitis, PSA-NCAM, intrinsic primary afferent neurons

Table des matières

<i>Page de titre</i>	<i>i</i>
<i>Page d'identification du jury</i>	<i>ii</i>
<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xiv</i>
<i>Avant-Propos</i>	<i>1</i>
<i>Le SNE</i>	<i>3</i>
Le plexus myentérique est divisé en trois niveaux de ramifications innervant le muscle lisse du tube digestif	5
Le plexus sous-muqueux est responsable du contrôle de la sécrétion dans l'intestin	7
Plusieurs autres réseaux neuronaux sont présents dans l'intestin	7
Les neurones du SNE sont classés selon leurs formes, leurs propriétés électrophysiologiques et leurs fonctions	8
Classification des neurones entériques selon la morphologie	8
Classification électrophysiologique des neurones entériques	9
Classification des neurones selon leurs fonctions	13
Les neurones du SNE forment des réflexes intrinsèques qui contrôlent la motilité, les échanges membranaires et la circulation sanguine dans l'intestin	15
Les IPANs	15
Interneurones	18
Motoneurones	19
Neurones intestinofugaux	20

Les cellules entéroendocrines	20
Les cellules interstitielles de Cajal	21
Les cellules gliales entériques	22
Le SNC peut moduler l'activité des programmes du SNE	22
Le contrôle de l'intestin par le cerveau	22
Les réflexes vago-vagaux contrôlent l'action des microcircuits du SNE	25
<i>NCAM et PSA-NCAM</i>	26
Structure de NCAM	26
Enzymes de régulation de PSA-NCAM	27
Rôles de NCAM et PSA-NCAM	29
Adhésion physique	29
Signalisation intracellulaire	30
Absence de PSA, NCAM, PST et STX	34
Distribution de PSA-NCAM	35
La plasticité neuronale	35
PSA et la plasticité dans le SNC	36
La plasticité dans le SNE	36
<i>Maladies inflammatoires intestinales et SNE</i>	39
Les maladies inflammatoires intestinales	39
Plusieurs gènes sont associés aux maladies inflammatoires intestinales	39
L'inflammation dans les maladies inflammatoires intestinales est le résultat d'une fonction immunitaire déficiente	40
La réponse adaptative du système immunitaire dans la maladie de Crohn diffère de celle de la colite ulcéreuse.	41
Les modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales	42
Liens entre le SNE et le système immunitaire	44
Le SNE influence le système immunitaire	45
Le système immunitaire influence le SNE	45
Influence de l'inflammation intestinale sur le SNE	46
<i>Hypothèses et objectifs de l'étude</i>	48

<i>Manuscrit</i> _____	49
<i>Discussion</i> _____	75
Réexpression de PSA-NCAM _____	75
Spécificité de la réexpression dans les IPANs _____	76
Expression des transcrits des enzymes régulatrices de PSA-NCAM _____	77
Conclusion _____	78
<i>Bibliographie</i> _____	80

Liste des tableaux

Tableau I: *Types de neurones composant le SNE* _____ 14

Tableau II: *Principaux modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales* _____ 45

Liste des figures

- Figure 1** *Représentation schématique de l'organisation du système nerveux entérique dans le tube digestif* _____ 4
- Figure 2** *Organisation des plexi du SNE* _____ 6
- Figure 3** *Exemple de neurones classifiés selon leur morphologie* _____ 9
- Figure 4** *Représentation schématique du courant dans les neurones de type AH, caractérisé par la présence de deux périodes d'hyperpolarisation* _____ 12
- Figure 5** *Organisation et fonctionnement des neurones sensoriels intrinsèques de l'intestin (IPANs)* _____ 17
- Figure 6** *L'activité du système nerveux entérique est régulée par un apport des centres supérieurs du cerveau* _____ 24
- Figure 7** *Représentation schématique de la structure de la molécule d'adhésion neuronale NCAM et de sa forme polysialylée (PSA-NCAM)* _____ 27
- Figure 8** *Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires déclenchées par NCAM* _____ 31

Liste des abréviations

5-HT	Sérotonine
Ach	Acétylcholine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CamK	Calmoduline
CARD15	<i>Caspase recruitment domain protein 15</i>
CCK	Cholécystokinine
CEC	Cellules entérochromaffines
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
ChAT	Choline acétyltransferase
CIC	Cellules interstitielles de Cajal
CIC-PM	CIC du plexus myentérique
CIC-PSM	CIC du plexus sous-muqueux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMM	Complexe myoélectrique migrateur
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAG	Diacylglycérol
DSS	Dextran sulfate de sodium
EGFR	<i>Epithelial growth factor (EGF) receptor</i>
ENK	Enképhaline
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR	Récepteur du FGF
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GAL	Galanine
GAP-43	<i>Growth associated protein-43</i>
GDNF	<i>Glial derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary associated protein</i>
GRP	<i>Gastrin releasing peptide</i>
Hsp60	<i>Heat shock protein 60</i>

HVA	<i>High voltage activated</i>
IFN-γ	Interféron- γ
IL-2/4/5/6/10/12/17/23	Interleukine-2/4/5/6/10/12/17/23
IP₃	Inositol triphosphate
IPAN	<i>Intrinsic primary afferent neuron</i>
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAPK	<i>Microtubule associated protein kinase</i>
NADPH diaphorase	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase</i>
NCAM	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartic acid receptor</i>
nNOS	<i>Neuronal NOS</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOD2	<i>Non-obese diabetic 2</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NPY	Neuropeptide Y
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
NTS	Noyau du <i>tractus solitarius</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGP 9.5	<i>Protein gene product 9.5</i>
PKC	Phosphokinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
PPSE	Potentiels post-synaptiques excitateurs
PSA	<i>Polysialic acid</i>
PSA-NCAM	<i>Polysialated neuronal cell adhesion molecule</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SERT	Transporteur de la sérotonine
SH2	<i>Src homology domain 2</i>

SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNE	Système nerveux entérique
SOM	Somatostatine
sP	Substance P
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEA	Tetraethylammonium
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
Th1	Cellule T <i>helper</i> 1
Th2	Cellule T <i>helper</i> 2
TK	Tachykinine
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNBS	<i>2,4,6 trinitrobenzoic acid</i>
TTX	Térodotoxine
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

«Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre»

- Marie Curie

Remerciements

Je voudrais remercier Dr. Christophe Faure pour son incroyable et inestimable disponibilité, sa patience et la toute la latitude dont il m'a permis de jouir au cours de ce projet. Il a su me motiver, m'aiguiller et m'encourager dans tous mes projets.

Merci également à Cindy Gauthier pour sa patience et son soutien. Cindy m'a, jour après jour, d'une multitude de manières aidé, encadré et permis d'acquérir des aptitudes solides en recherche.

Je voudrais également remercier Dr. Dorothée Dal Soglio, qui m'a généreusement accordé de son temps pour effectuer, m'aider à comprendre et à interpréter l'évaluation histologique liée à mon projet.

Merci à Joseph Meyer Bouskila pour l'aide sur la partie d'évaluation de l'activité de la myeloperoxydase.

Merci aux étudiants et au personnel du laboratoire du Dr. Sylvain Chemtob, qui m'ont permis d'utiliser leur microscope à fluorescence.

Avant-Propos

Le système nerveux entérique (SNE) est la division la plus importante du système nerveux autonome (SNA), composé de neurones et de cellules de support situés dans la paroi du tube digestif.¹ Le SNE est organisé en ganglions formant deux plexi majeurs. Le plexus myentérique est situé entre les couches de muscles longitudinaux et circulaires et le plexus sous-muqueux entre le muscle circulaire et la muqueuse. Plusieurs similitudes existent entre le SNE et le système nerveux central (SNC). Ces deux systèmes comportent tous les types de neurones nécessaires à la formation de réflexes intrinsèques. Bien qu'un contrôle puisse s'opérer sur le SNE à partir du SNC, le système digestif est capable de fonctionner sans apport des centres de contrôle supérieurs. Les réflexes intrinsèques du SNE contrôlent la motilité, l'absorption, la sécrétion et la circulation sanguine dans le tube digestif.

La molécule d'adhésion neuronale (*neural cell adhesion molecule* – NCAM) est impliquée dans le guidage des neurones durant le développement.² Les molécules de NCAM présentes sur la surface des neurones permettent des liaisons à NCAM ou d'autres molécules de guidage sur le substrat. NCAM est également impliquée dans la signalisation intracellulaire. Deux polysialyltransférases (PST et STX) régulent l'ajout d'une chaîne d'acide polysialylique (*polysialic acid* - PSA) sur NCAM. PSA réduit l'adhésion de NCAM et modifie son micro-environnement, changeant ainsi ses propriétés de signalisation. PSA-NCAM est exprimé de façon importante dans tout le système nerveux (y compris dans le SNE) au cours du développement et est absent chez l'adulte, sauf dans quelques régions plastiques du cerveau. Dans le SNC mature, PSA-NCAM peut être réexprimée aux sites ayant subi des lésions.^{3,4} PSA-NCAM est donc une molécule associée à la plasticité du SNC. Dans le SNE, plusieurs perturbations induisent la plasticité.⁵

Les maladies inflammatoires intestinales (la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) sont des maladies causées par un désordre du système immunitaire, celui-ci devenant autoréactif envers des bactéries commensales de l'intestin.⁶

Les patients atteints de ces maladies portent souvent une prédisposition génétique. Plusieurs modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales existent.⁷ Le modèle de colite induite par l'acide trinitrobenzoïque (2,4,6 *trinitrobenzoic acid* - TNBS) reproduit une inflammation transmurale similaire à celle observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn.⁸ Les maladies inflammatoires intestinales induisent des changements importants dans l'organisation et la fonction du SNE.⁹⁻¹²

Le but de cette étude était de vérifier, quantifier et décrire l'expression de PSA-NCAM et des transcrits de ses enzymes régulatrices dans le plexus myentérique du SNE dans un modèle adulte de colite.

Une revue de littérature décrivant le système nerveux entérique, PSA-NCAM et les maladies inflammatoires intestinales est présentée de façon à réunir les éléments nécessaires à la compréhension des données. Le manuscrit décrit les expériences effectuées et le lien établi entre la molécule d'adhésion PSA-NCAM et les maladies inflammatoires intestinales. Finalement, une discussion générale des résultats obtenus conclue le mémoire.

Le SNE

Le SNE forme une des trois divisions du système nerveux autonome (SNA)¹³

Les fonctions du SNA consistent en l'ajustement de l'activité des tissus et organes pour une interaction optimale entre le corps et son environnement.¹⁴

Avec les systèmes nerveux sympathiques, parasympathiques et quelques centres supérieurs d'intégration du SNC, l'organisation du SNE permet la régulation de l'activité des organes digestifs.^{14,15}

Les plexi myentériques ou d'Auerbach et sous-muqueux ou de Meissner du SNE sont organisés en ganglions formés de cellules nerveuses et gliales et connectés par des faisceaux de fibres nerveuses.¹³ Le SNE comporte autant de neurones que la moelle épinière.

Le plexus myentérique est divisé en trois niveaux de ramifications innervant le muscle lisse du tube digestif

Le plexus myentérique est présent de la partie orale de l'œsophage jusqu'au sphincter anal (Fig. 1A). Il est situé entre les couches musculaires longitudinales et circulaires du tube digestif (Fig. 1B). La division primaire du plexus myentérique est formée de ganglions (corps cellulaires nerveux et gliaux) et de faisceaux de fibres nerveuses (Fig. 2A). Certains faisceaux contournent les ganglions pour connecter plus loin, avec un autre ganglion. La division secondaire est composée de faisceaux de fibres nerveuses plus fins, connectant entre eux les fibres internodales. Ces faisceaux secondaires ne connectent pas directement les ganglions. Les fibres du plexus secondaire innervent le muscle circulaire. La division tertiaire est composée de faisceaux de fibres nerveuses encore plus minces, originaires des divisions primaires et secondaires du plexus myentérique. Ces fibres innervent une partie du muscle longitudinal. La distribution des neurones et la grosseur des ganglions varie selon la région du SNE. De plus, la forme du plexus est dépendante de la déformation du tube digestif causée par les contractions. Les rôles qu'exerce le plexus dans différentes régions dépendent de la population de neurones le composant.

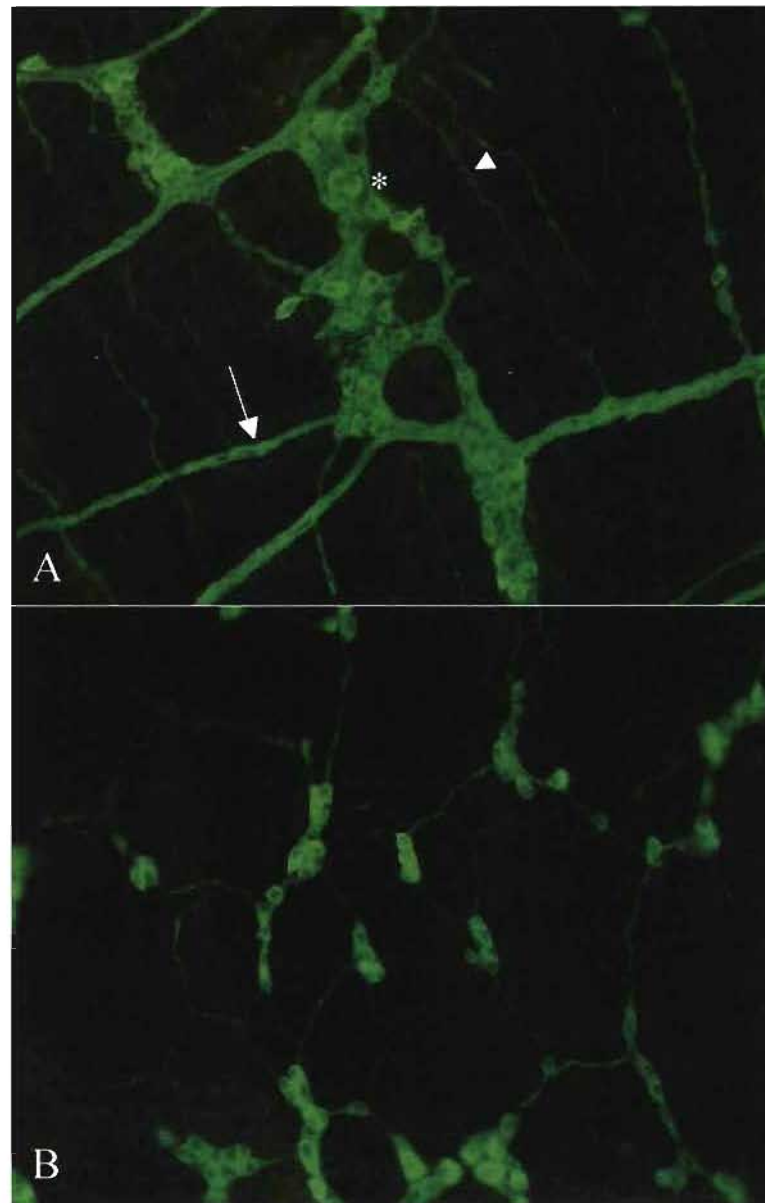


Figure 2 Organisation des plexi du SNE. Les plexi sont marqués à l'aide d'un marqueur neuronale ubiquitaire (*protein gene product 9.5* - PGP 9.5). (A) Les 3 sous-divisions du plexus myentérique sont visibles. La division primaire du plexus (*) relie les ganglion entre eux. La division secondaire (flèche) relie les fibres intermodales. La division tertiaire (tête de flèche) comprend des faisceaux très minces qui originent des divisions primaires et secondaires. (B) Les neurones du plexus sous-muqueux sont visibles en un arrangement plus diffus que dans le plexus myentérique. (Gauthier 2006, données non publiées)

Le plexus sous-muqueux est responsable du contrôle de la sécrétion dans l'intestin

On retrouve le plexus sous-muqueux majoritairement dans le petit intestin et le côlon, avec quelques ganglions isolés associés à des glandes dans la paroi de l'œsophage et de l'estomac (Fig. 1A). Le plexus sous-muqueux est situé entre la muqueuse intestinale et le muscle circulaire (Fig. 1B). Le plexus sous-muqueux est composé de moins de neurones que le plexus myentérique, mais est similairement organisé en ganglions reliés par des faisceaux de fibres nerveuses (Fig. 2B). Les neurones du plexus sous-muqueux ne sont pas des contributeurs majoritaires au contrôle des muscles qui régissent la motilité. Le plexus sous-muqueux comporte des sécrétomoteurones responsables de l'activité sécrétrice de la muqueuse. Chez les humains, les ganglions du plexus sous-muqueux forment des couches à différentes profondeurs de la sous-muqueuse. Les couches plus près du muscle circulaire l'innervent, tandis que les ganglions situés plus près de la muqueuse modulent la fonction de celle-ci. Chez le rat et le cobaye, le plexus sous-muqueux ne comporte qu'une seule couche de neurones composée de sécrétomoteurones en majorité.

Plusieurs autres réseaux neuronaux sont présents dans l'intestin

Des ganglions sont présents dans la *lamina propria* de la muqueuse du petit intestin et du côlon. Également, à la surface externe des organes digestifs, des faisceaux nerveux très minces s'étendent sous la séreuse. Ces nerfs font connexions avec les extensions nerveuses extrinsèques et celles de la paroi du tube digestif. Un plexus est également présent dans les régions épaisses de la couche de muscle longitudinale, en plus de son innervation par la sous-division tertiaire du plexus myentérique. Le muscle circulaire est quant à lui innervé par un plexus émanant des divisions primaires et secondaires du plexus myentérique. Les plexi, bien que décrits indépendamment les uns des autres possèdent des connexions multiples entre eux. Des connexions ont été décrites entre le nerf vague et le plexus myentérique via le plexus sous-séreux. De

nombreuses connexions entre le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux par des fibres verticales sont également observées.

Les neurones du SNE sont classés selon leurs formes, leurs propriétés électrophysiologiques et leurs fonctions

Classification des neurones entériques selon la morphologie

C'est à Dogiel, à la fin du 19^e siècle qu'on doit une classification des neurones entériques selon leur forme. Les neurones de type Dogiel I sont généralement aplatis dans le plan du plexus, avec 4 à 20 dendrites et un seul axone (Fig. 3A).
13,16

Les neurones de type Dogiel II sont les plus nombreux dans les plexus myentériques et sous-muqueux du petit intestin et du côlon.¹³ Ils sont très rares dans l'estomac. Leur corps cellulaire est arrondi et seulement quelques longs axones (3 à 10) originent de celui-ci (Fig. 3B). Les Dogiel type II peuvent être des neurones pseudo unipolaires. Généralement, les projections des neurones Dogiel II sont orientées circonférentiellement, vers les corps cellulaires d'autres neurones dans le même plexus ou dans la muqueuse.

Les neurones de type Dogiel III sont généralement plus petits^o et comptent un nombre plus restreint de projections (Fig. 3C). Ces dernières se terminent souvent dans le ganglion dont elles originent.

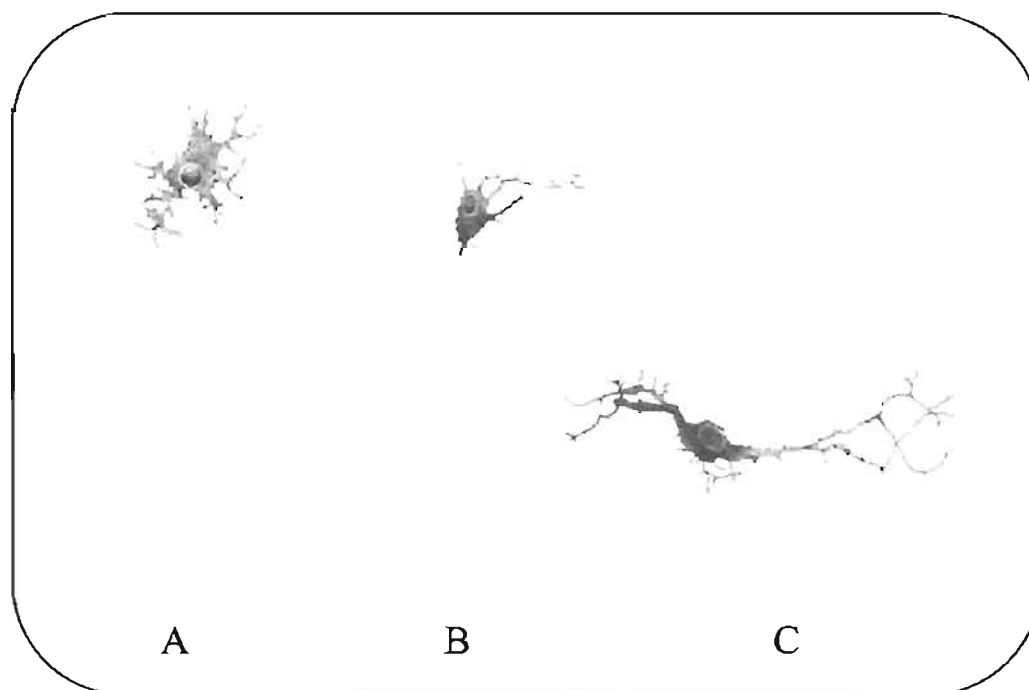


Figure 3 Exemple de neurones classifiés selon leur morphologie. (A) Neurone de type Dogiel I, (B) de type Dogiel II, (C) et de type Dogiel III du plexus myentérique du rat et du cobaye. (Tirées de ¹³)

Classification électrophysiologique des neurones entériques

En enregistrant les comportements électrophysiologiques des neurones du SNE, on classifie ceux-ci en deux classes : les neurones dites synaptiques (S) et hyperpolarisantes (*afterhyperpolarization* – AH).^{11,13}

Les neurones de type S

Les neurones de type S démontrent des potentiels d'action rapides bloqués par la tétrodotoxine (TTX) suivis d'une courte hyperpolarisation.^{13,17} Les neurones S peuvent arborer une forme de type Dogiel I, vu la présence d'un seul axone et ne sont jamais de type Dogiel II.¹³ Des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) peuvent être déclenchés dans ces neurones.^{13,17} Ces PPSE provenant de différents neurones peuvent s'additionner et déclencher un potentiel d'action dans les neurones de type S.

Les neurones de type AH

Les neurones de type AH démontrent des potentiels d'action de grande amplitude (75-110 mV) et une période caractéristique d'hyperpolarisation en deux phases (précoces et tardives) (Fig. 4).^{13,16,18,19} Les AH sont retrouvés dans les deux plexi du SNE.^{17,19} Suite à une dépolarisation de la membrane des neurones de type AH, un potentiel d'action est déclenché par l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants, sensibles à la TTX et/ou de canaux calciques également sensibles au voltage mais non à la TTX.^{13,17,18} Les potentiels d'actions sont influencés majoritairement par l'ouverture de l'un et/ou l'autre de ces canaux selon la région de la cellule dans laquelle le potentiel d'action est déclenché.^{13,18,20} Activés à un potentiel membranaire d'environ -60 mV, les canaux sodiques sensibles au voltage et à la TTX contribuent de façon importante à la dépolarisation de la membrane et à la création de potentiels d'action.^{13,18} Ces canaux s'inactivent rapidement vers -10 mV et nécessitent un retour à -100 mV pour se désinactiver. Les autres contributeurs au potentiel d'action, les canaux calciques sensibles au voltage, font partie de la famille des canaux calciques activés à de hauts potentiels (*high voltage activated, HVA*). Ces canaux contribuent à l'entrée de cations seulement à des voltages élevés, se désactivant une fois le voltage revenant à des valeurs de repos, par l'activation de canaux potassiques de rectification sensibles au tétraéthylammonium (TEA). Ces derniers en combinaison avec des canaux potassiques sensibles au calcium et au voltage sont responsables de la première phase d'hyperpolarisation suivant le potentiel d'action des neurones AH.^{13,18,19}

La phase d'hyperpolarisation tardive est déclenchée par un courant hyperpolarisant (I_{AHP}) généré par l'ouverture de canaux potassiques sensibles au calcium.^{13,18} L'hyperpolarisation résultante est suffisante pour contrôler la génération de potentiels d'action. On peut attribuer à I_{AHP} le contrôle de la rythmicité des réflexes péristaltiques dans l'intestin. Les canaux responsables du courant potassique hyperpolarisant tardif sont dépendants de la présence de calcium, pouvant provenir de stocks intracellulaires. La libération de calcium intracellulaire par le calcium entrant suite à une dépolarisation active la

calcineurine, enzyme responsable de la déphosphorylation des canaux potassiques et donc de l'augmentation de la probabilité d'ouverture de ceux-ci. L'hyperpolarisation causée par I_{AHP} est responsable du développement, en abaissant le potentiel de membrane, d'un courant cationique non spécifique (I_h) dépolarisant qui contribue au retour du potentiel membranaire à sa valeur de repos.

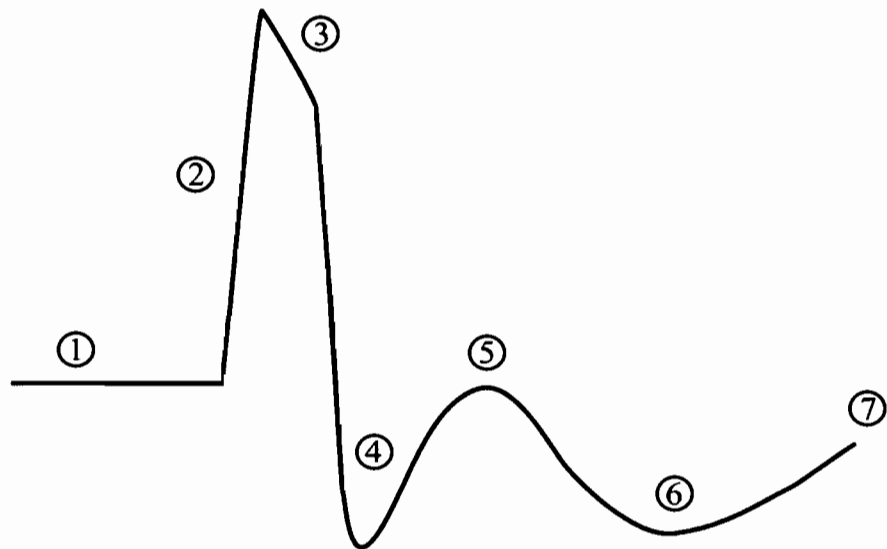


Figure 4 Représentation schématique du courant dans les neurones de type AH, caractérisé par la présence de deux périodes d'hyperpolarisation. (1) Le courant de repos est assuré par les courants cationiques non-spécifiques I_H et hyperpolarisants I_{AHP} . (2) L'ouverture de canaux sodiques et/ou de canaux calciques cause un potentiel d'action. (3) La repolarisation s'amorce lors de l'ouverture de canaux potassiques de rectification. (4) Le calcium intracellulaire accumulé active des canaux potassiques sensibles au calcium et au voltage qui causent la phase précoce d'hyperpolarisation. (5) Ces canaux se ferment ensuite à un potentiel plus bas, laissant I_H dépolariiser temporairement la membrane. (6) L'ouverture complète de tous les canaux potassiques sensibles au calcium cause une augmentation de I_{AHP} et cause la deuxième phase d'hyperpolarisation typique de ce type de neurones. (7) Le potentiel de repos est atteint à nouveau par la deuxième phase d'hyperpolarisation qui réactive le courant I_H . (Schéma modifié de ¹³)

Classification des neurones selon leurs fonctions

Les fonctions des neurones sont souvent dépendantes des neurotransmetteurs exprimés par les cellules nerveuses. Plusieurs marqueurs sont utilisés pour décrire les populations neuronales du SNE.²¹ Des marqueurs comme l'enolase spécifique aux neurones (*neuron specific enolase* - NSE) ou le *protein gene product 9.5* (PGP 9.5) marquent la totalité des neurones. D'autres marqueurs permettent de définir les différents types de neurones dans le SNE (Tableau I).^{13,18,21} Les principaux neurotransmetteurs exprimés dans le SNE sont les mêmes que dans le SNC. On retrouve par exemple l'acétylcholine (ACh), le neuropeptide Y (NPY) et les tachykinines (TK) dans les neurones excitateurs et l'oxyde nitrique (*nitric oxide* – NO), la synthase de l'oxyde nitrique (*nitrous oxide synthase* – NOS) et le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) dans les neurones inhibiteurs. Les neurones ont la capacité de changer de fonction (degrés d'expression de différents neurotransmetteurs) selon la condition dans laquelle ils se trouvent.¹⁵

Tableau I Types de neurones composant le SNE. Les types de neurones sont très bien décrits dans le SNE du cobaye. Les peptides et neurotransmetteurs exprimés par les neurones permettent de les identifier. Leurs fonctions ont été décrites et associées à leurs morphologies et les neurotransmetteurs qu'ils utilisent. (Tiré et modifié de^{1,13,18,21})

Fonction	Proportion	Morphologie	Neurotransmetteurs
Plexus myentérique			
Motoneurones excitateurs	37%	Dogiel I	ChAT/TK
Motoneurones inhibiteurs	18%	Dogiel I	NOS/VIP/PACAP/NPY
Interneurones ascendants	5%	Dogiel I	ChAT/Calretinine/TK/ENK
Interneurones descendants des réflexes locaux	5%	Dogiel I	ChAT/NOS/VIP
Interneurones descendants des réflexes motiles et sécrétoires	2%	Dogiel I	ChAT/5-HT
Interneurones descendants	4%	Dogiel III	ChAT/SOM
IPANs	26%	Dogiel II	ChAT/calbindine/TK
IFANs	<1%	Dogiel I	ChAT/VIP/NOS/CCK/ENK
Plexus sous-muqueux			
Sécrétomotoneurones, vasodilatateurs non-cholinergiques	45%	Dogiel I	VIP/CART/CRF/GAL/PACAP
Sécrétomotoneurones, vasodilatateurs cholinergiques	15%		ChAT/Calretinine/dynorphine
Sécrétomotoneurones cholinergiques	29%		ChAT/NPY/CCK/SOM/CGRP/Dynorphine
IPANs	11%	Dogiel II	ChAT/calbindine/TK
Motoneurones excitateurs de la <i>muscularis mucosae</i>		Dogiel I	ChAT/TK
Motoneurones inhibiteurs de la <i>muscularis mucosae</i>		Dogiel I	NOS/VIP

5-HT : sérotonine, CCK : cholécystokinine, CGRP : *calcitonin gene-related peptide*, ChAT : choline acétyltransférase, ENK : enképhalines, GABA : acide γ -amino butyrique, GAL : galanine, GRP : *gastrin releasing peptide*, IFANs : intestinofugal neurons, IPANs : *intrinsic primary afferent neurons*, NO : *nitrous oxide*, NOS : *nitrous oxide synthase*, NPY : neuropeptide Y, PACAP : *pituitary adenyl cyclase activating peptide* SOM : somatostatine, sP : substance P, TK : tachykinine, VIP : *vasoactive intestinal peptide*.

Les neurones du SNE forment des réflexes intrinsèques qui contrôlent la motilité, les échanges membranaires et la circulation sanguine dans l'intestin

En comportant comme le SNC des arcs réflexes complets, le SNE n'est pas un simple relais de l'information provenant du SNC comme les autres ganglions autonomes.²² Le SNE est capable d'intégrer les signaux en encodant l'information provenant des différents stimuli et en déclenchant une réponse appropriée dans le tube digestif. Les *IPANs* ou neurones sensoriels intrinsèques perçoivent le changement de condition dans la lumière intestinale et transmettent le signal aux neurones effecteurs qui contrôlent l'activité du tube digestif.^{13,23,24}

Les *IPANs*

Morphologie

Les neurones *IPANs* ont une morphologie de type Dogiel II et toutes les caractéristiques électrophysiologiques des neurones AH.^{1,13,16,21,25,26} Ils comportent généralement un gros corps cellulaire et démontrent de l'immunoréactivité pour la calbindine, la substance P (sP) et la choline acétyltransférase (ChAT) (Tableau I).^{21,25-27}

Réponses aux stimuli

Les *IPANs* détectent le changement d'état de l'intestin (distension, pH, présence d'acides gras à chaîne courte ou de glucose) et sont situés dans les plexi myentériques et sous-muqueux (Fig. 5).^{1,18,22,23,24-26,28,29} Les *IPANs* des deux plexi, ayant leurs terminaisons liées aux muscles par des fibres de collagène, répondent à la distorsion créée par l'étirement ou le brossage de la muqueuse.^{1,18,24,26,29} Cette distorsion provoque l'ouverture de canaux mécanorécepteurs et la dépolarisation subséquente de la membrane neuronale.^{1,13} L'amplitude et la durée de l'étirement déterminent le patron d'activation des neurones.^{1,18} Par contre, des canaux potassiques de type BK,

activés par le calcium et situés sur le corps cellulaire des *IPANs* myentériques, réagissent à l'étirement provoqué par les contractions normales de l'intestin. Ces canaux hyperpolarisent la membrane suite aux mouvements normaux, pour empêcher une activation non-justifiée des canaux sensibles à l'étirement du tube digestif. Les *IPANs* projettent vers des interneurons ascendants et descendants ou directement vers les motoneurones.^{22,28} Les interneurons font synapses avec les motoneurones, qui, une fois activés, déclenchent la contraction des muscles en amont du stimulus et un relâchement de ceux en aval.²² Ces contractions et relâchements simultanés ont pour conséquence le péristaltisme.^{22,28}

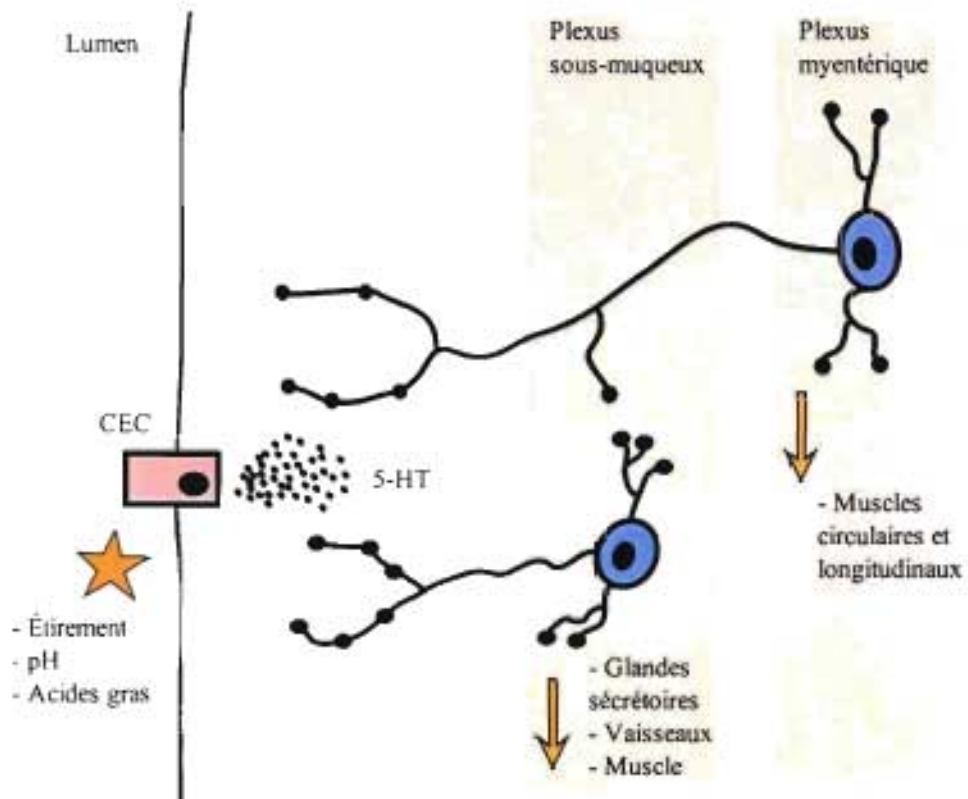


Figure 5 Organisation et fonctionnement des neurones sensoriels intrinsèques de l'intestin (*IPANs*). Les *IPANs* des deux plexi recueillent l'information de la lumière intestinale et la transmettent via des interneurones et des motoneurones à des cellules qui contrôlent l'activité du tube digestif. L'information peut être perçue directement par les terminaisons des *IPANs* ou via les cellules entéroendocrines. Les cellules entérochromaffines (CEC) libèrent la sérotonine (5-HT). Celle-ci active les terminaisons nerveuses des *IPANs*. Les *IPANs* sous-muqueux contrôlent la sécrétion, l'absorption, la circulation sanguine et l'activité d'une portion du muscle circulaire de l'intestin. Les *IPANs* myentériques contrôlent l'activité des couches musculaires circulaires et longitudinales. *Inspiré de*³⁰.

Les *IPANs* récoltent donc l'information sur la distension du tube digestif et la transmettent à des sécrétomoteurones et des neurones vasodilatateurs.^{13,18,22}

Ces deux types de neurones effecteurs régulent la sécrétion par les glandes présentes dans la couche sous-muqueuse et la circulation dans l'intestin. Les signaux chimiques et de distension déclenchent également les réflexes de motilité. La quantité de liquide dans l'intestin augmente avec les contractions permettant la bonne circulation des aliments digérés.

Les *IPANs* détectent également des stimuli nociceptifs dans le tube digestif.^{13,22}

Exposé à une surcharge bactérienne ou à des toxines par exemple, le tube digestif déclenche des réflexes sécrétoires et moteurs exagérés, résultant en diarrhée pour expulser les agents nocifs.

Les terminaisons nerveuses des *IPANs* ne sont pas en contact avec la lumière intestinale. Les stimuli chimiques ne peuvent donc agir directement que s'ils traversent la barrière épithéliale. Le signal luminal peut également être transmis par des cellules entéroendocrines comme les cellules entérochromaffines (CEC) qui libèrent la sérotonine (5-HT) suivant leur stimulation.^{13,30}

Interneurones

Les interneurones du SNE peuvent être ascendants (projetant en direction orale) ou descendants (direction anale).^{1,21} Les interneurones sont généralement associés morphologiquement aux types Dogiel I et électrophysiologiquement aux neurones de type S.^{16,21,24,31} Un type d'interneurones ascendants et trois

types d'interneurones descendants ont été recensés dans le SNE (Tableau I).^{1,16,18,21,32} Les interneurones ascendants (ChAT/Calrétinine/TK/ENK) et deux types d'interneurones descendants (ChAT/NOS/VIP et ChAT/5-HT) sont impliqués dans les réflexes locaux contrôlant la motilité et la sécrétion.^{1,13,21}

L'autre type d'interneurones descendants (ChAT/SOM) est impliqué dans le contrôle des complexes myoélectriques migrateurs (CMM).^{1,13,18,21,23} Ces complexes sont des vagues de contractions lentes voyageant de l'estomac à l'iléon, impliquées dans le mouvement du petit intestin lors du jeûn.¹³

Motoneurones

Dans le SNE, les motoneurones peuvent être excitateurs ou inhibiteurs.^{1,21} Ils innervent les muscles longitudinaux, circulaires, la *muscularis mucosae*, les multiples glandes du tube digestif et les vaisseaux sanguins.^{1,13,16} Les motoneurones ont généralement des caractéristiques électrophysiologiques de type S et leur corps cellulaire peut être contenu dans le SNE ou le SNC.

Motoneurones innervant les muscles du tube digestif

Le muscle longitudinal est innervé majoritairement par les motoneurones du plexus myentérique.^{1,13} Dans le SNE du cochon et d'autres animaux de grande taille, chez qui le tube digestif est plus épais, le muscle longitudinal est également innervé en partie par des motoneurones dans la couche externe de ganglions du plexus sous-muqueux.¹³ Dans le tube digestif mince des animaux de petite taille comme le rat et le cobaye, le muscle circulaire est innervé en majorité par le plexus myentérique et minoritairement par le plexus sous-muqueux. Chez les plus grands animaux, la couche externe du plexus sous-muqueux est responsable de l'innervation complète du muscle circulaire.

Les motoneurones excitateurs projettent oralement et analement tandis que les motoneurones inhibiteurs ne projettent que vers l'anus. Les motoneurones excitateurs utilisent l'ACh et les TK comme neurotransmetteurs (Tableau I).^{1,21} La TK la plus répandue est la sP. Chez les motoneurones inhibiteurs, la NO est très répandue comme neurotransmetteur. VIP, PACAP, NOS et l'ATP sont également retrouvés couramment dans ce type de neurones.

Les sécrétomotoneurones et les neurones vasodilatateurs

La sécrétion de fluides par les glandes requiert un apport en eau et en électrolytes provenant du sang. L'innervation des glandes est donc couplée à celle des vaisseaux sanguins de l'intestin.^{1,13} Les neurones vasodilatateurs et sécrétomoteurs ont une morphologie de type Dogiel III.²¹ Trois types de neurones forment la population de sécrétomotoneurones et de neurones vasodilatateurs dans l'intestin.^{13,21} Le premier type, non-cholinergiques, contient du VIP et innerve la muqueuse (glandes) et les artérioles de la paroi

intestinale (Tableau I).^{1,13,21} Les deuxièmes et troisièmes types, cholinergiques, contiennent respectivement la calrétinine et le NPY. Le deuxième type innerve les glandes et les vaisseaux tandis que le troisième type innerve seulement les glandes de la muqueuse.

Neurones intestinofugaux

Les neurones intestinofugaux (IFANs), dont le corps cellulaire est situé dans le plexus myentérique, récoltent directement et indirectement l'information de la lumière intestinale et projettent aux ganglions sympathiques pré-vertébraux.^{13,23,33} La majorité des neurones intestinofugaux ont une morphologie de type Dogiel I, sont cholinergiques et démontrent de l'immunoréactivité pour VIP (Tableau I).^{13,21} Des changements dans la longueur ou le volume de l'intestin activent les IFANs.^{13,23} Ils forment la portion afférente des réflexes entéro-entériques originaires de l'intestin et agissant sur celui-ci.^{13,23,33} Les neurones activés par les neurones intestinofugaux sont des neurones sympathiques inhibiteurs de l'activité des neurones moteurs et sécrétoires de l'intestin.^{13,33} Ces réflexes sont complètement indépendants du SNC. Les réflexes entéro-entériques inhibent donc la motilité et la sécrétion dans l'intestin.

Les cellules entéroendocrines

Dans le système nerveux, certains neurones sensoriels recueillent eux-mêmes l'information qu'ils transmettent ensuite aux autres neurones des réseaux nerveux. D'autres neurones sensoriels n'ont aucun contact avec le stimulus.²⁸

Dans l'intestin, les cellules entéroendocrines médient la transmission du signal de la lumière vers les arcs réflexes contenus dans la paroi du tube digestif.

Les cellules entéroendocrines (ex. les CEC relâchant la 5-HT) sont activées par un stimulus et transmettent le signal de façon paracrine, en activant les terminaisons nerveuses des neurones sensoriels. Les stimulants lumineux peuvent être mécaniques (contractions, étirement au passage du bol) ou chimiques (antigènes, nutriments, irritants, sécrétions entériques) (Fig. 5).

Les CEC contiennent 95% de la sérotonine du corps en entier.^{28,30,34} Suite à la stimulation par un agent externe, les CEC libèrent la sérotonine qui active à son tour une quinzaine de récepteurs différents, tous ayant des rôles particuliers. On croit que la sérotonine libérée par les CEC et les neurones sérotoninergiques est responsable de l'initiation du réflexe péristaltique.^{13,28}

Les cellules interstitielles de Cajal

Les cellules interstitielles de Cajal (CIC) sont issues du mésenchyme et forment un réseau qui transmet l'influx nerveux aux myocytes auxquels elles sont liées étroitement par des jonctions *gap*.^{13,15,35-37} Elles sont présentes dans le plexus myentérique (CIC-PM), dans le plexus sous-muqueux (CIC-PSM) et dans d'autres plexi neuronaux de l'intestin (plexus musculaire profond, plexus sous-séreux) entre les ganglions et projettent vers les cellules musculaires.^{37,38} Les différentes populations de CIC sont responsables de l'activité rythmique contractile lente de l'intestin.^{15,35,37,39} Elles médient la transmission de l'influx nerveux rythmique vers plusieurs fibres musculaires.^{35,36,39} Elles jouent également le rôle d'intermédiaires dans la transmission cholinergique excitatrice et nitroergique inhibitrice vers les myocytes.³⁹ Elles agissent enfin en tant que senseurs de la distension modulant le potentiel membranaire et la fréquence des vagues lentes de contraction.

Les CIC sont reconnues par leur expression de la tyrosine kinase *c-kit*.^{37,39} *C-kit* agit suite à la liaison du *stem cell factor* (SCF) et est nécessaire au développement des CIC³⁷ et demeure exprimé chez l'adulte. Vu leur rôle important dans le contrôle de l'activité électrique de l'intestin, des anomalies dans les CIC sont soupçonnées de jouer un rôle dans plusieurs pathologies (gastroparésie, pseudo-obstruction chronique et idiopathique de l'intestin, achalasie, constipation chronique).⁴⁰ Plusieurs modèles d'atteinte des CIC existent (knock-out pour *c-kit*, sténose, inflammation par un nématode) et permettent l'étude de leur rôle dans les désordres de la motilité gastrointestinale. Les CIC sont très plastiques pouvant facilement reformer des

réseaux suite à leur ablation dans les différents modèles animaux (voir p.37 *Sténose*).

Les cellules gliales entériques

Comme dans le SNC, des cellules gliales sont impliquées dans le support, la protection des ganglions et des faisceaux de fibres nerveuses et la survie des neurones dans le SNE.^{13,41} Ces cellules expriment les protéines s100b (impliquées dans la régulation du calcium intracellulaire) et la protéine fibrillaire gliale acide (*glial fibrillary acidic protein* - GFAP).¹³ Les cellules gliales entériques sont nécessaires au bon fonctionnement du tube digestif.⁴¹ Lorsqu'elles sont absentes du SNE, une entérite fulminante similaire à celle retrouvée dans les maladies inflammatoires intestinales survient. Ce phénomène suggère un rôle majeur des cellules gliales entériques dans la protection du système digestif contre les maladies inflammatoires.

Le SNC peut moduler l'activité des programmes du SNE

Bien que le SNE soit autonome et puisse fonctionner par lui-même en répondant à différents stimuli dans la lumière intestinale, son activité est modulée par différents réseaux nerveux hors de l'intestin.²² L'information est intégrée à plusieurs niveaux : dans le cerveau, la moelle épinière et les ganglions sympathiques prévertébraux. Le SNE peut en revanche récolter de l'information et la transmettre au SNC qui ajuste adéquatement l'activité du tube digestif. Ces liens bidirectionnels qui transitent via le nerf vague peuvent être comparés à un serveur informatique (le SNC) envoyant et récoltant des commandes gérées et produites par l'ordinateur (le SNE) qui utilise plusieurs programmes (les réflexes intrinsèques) pour agir.

Le contrôle de l'intestin par le cerveau

Plusieurs régions du cerveau (la région frontale du cortex, le noyau central de l'amygdale, la *stria terminalis*, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus) transmettent de l'information à la *medulla oblongata*, point de sortie des efférents vagues vers le SNE (Fig. 6).^{1,22} Les signaux des régions limbiques,

centres cérébraux liés aux émotions, sont également partagés avec ces régions cérébrales.²² Les émotions et le stress peuvent donc avoir des effets modulateurs sur la digestion. Les efférents vagues innervent les ganglions sympathiques de la région thoracico-lombaire et les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques de la région sacrale. Les projections de ces deux systèmes agissent sur les circuits intrinsèques du SNE.

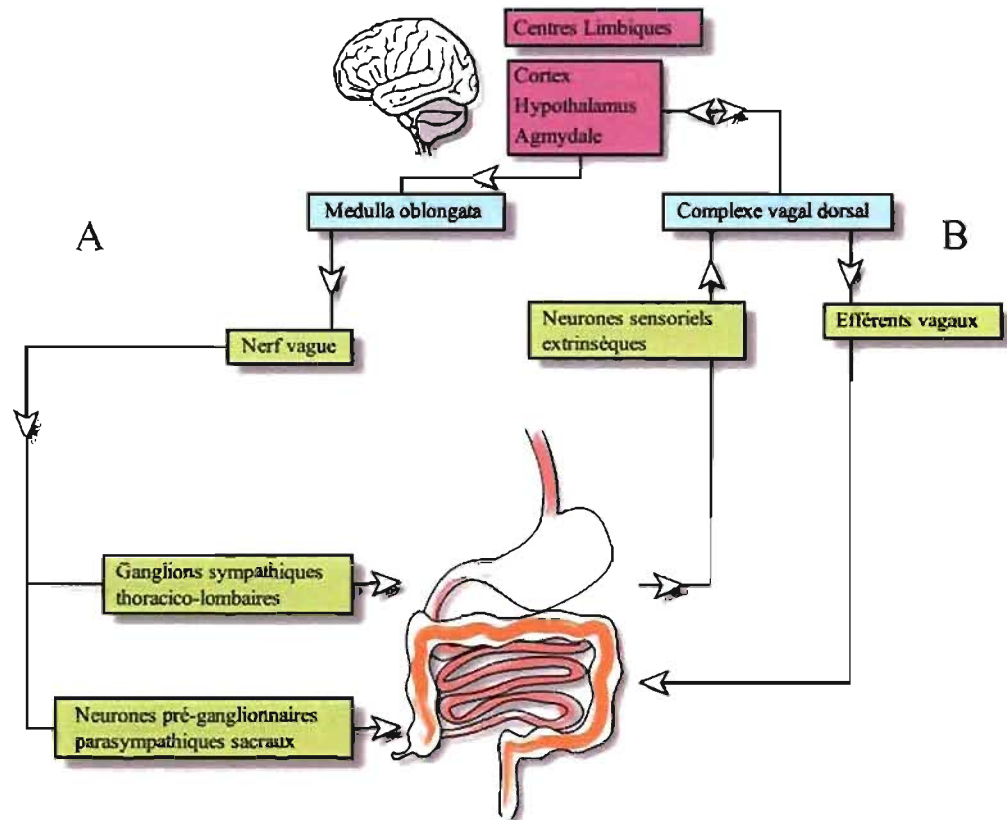


Figure 6 L'activité du système nerveux entérique est régulée par un apport des centres supérieurs du cerveau. (A) Plusieurs centres cérébraux transmettent de l'information via la *medulla oblongata* et le nerf vague vers les circuits responsables de l'activité du tube digestif. (B) La portion afférente des réflexes vago-vageaux est composée de neurones primaires afférents extrinsèques sensibles aux stimuli lumineux. Ces informations sont intégrées dans divers centres supérieurs cérébraux. Les efférents vageaux émergent du complexe vagal dorsal et affectent l'activité des circuits du tube digestif. (*Inspiré de²²*)

Les réflexes vago-vagaux contrôlent l'action des microcircuits du SNE

Des neurones sensoriels émanant du tube digestif réagissent au brossage de la muqueuse, à la distension musculaire et aux conditions chimiques dans la lumière du tube digestif supérieur et projettent vers les centres nerveux supérieurs par le nerf vague. Ces neurones font synapses dans le noyau du *tractus solitarius* (NTS), la porte d'entrée des sensations viscérales dans le cerveau.^{22,42} À partir du NTS, l'information est disséminée dans le noyau moteur dorsal du nerf vague et dans quelques centres supérieurs du cerveau (noyau parabrachial, hypothalamus, amygdale, cortex insulaire).⁴² C'est une portion du noyau moteur dorsal du nerf vague et du *tractus solitarius*, avec l'*area postrema* et le *nucleus ambiguus*, qui forment le complexe vagal dorsal.²²

Les neurones du complexe vagal dorsal représentent la partie efférente des réflexes vago-vagaux servant à contrôler des réponses comportementales alimentaires, des sensations physiopathologiques et les réflexes et fonctions du tube digestif.^{22,42} Ces neurones font connexions avec le SNE, permettant un ajustement fin des arcs réflexes intrinsèques par le SNC.²²

NCAM et PSA-NCAM

Au cours de son développement de son remodelage, une multitude de molécules permettent la bonne organisation ou réorganisation du SNE. NCAM est une molécule d'adhésion neuronale présente dans tout le SNC et le SNE.⁴³ Elle est la molécule d'adhésion la plus largement exprimée dans le muscle et le système nerveux de l'embryon.⁴⁴

Elle dirige physiquement, suivant une modulation par l'addition de résidus d'acide polysialylique (*polysialic acid* - PSA), la migration des neurones et la croissance des axones pendant le développement ainsi que le remodelage dans certaines zones plastiques du cerveau.^{2,45-47} Elle agit également comme molécule de signalisation intracellulaire pour stimuler l'expression de molécules impliquées dans la plasticité neuronale.⁴⁸⁻⁵¹

Structure de NCAM

NCAM est une molécule d'adhésion de la famille des immunoglobulines comportant 5 domaines Ig et 2 domaines d'homologie à la fibronectine de type 3 (Fig. 7).² Trois isoformes (NCAM-180, NCAM-140 et NCAM-120) existent en plus des variants d'épissage alternatifs de NCAM spécifiques à différents types de cellules.^{2,47} Les isoformes NCAM-180 et NCAM-140 comportent une région transmembranaire et NCAM-120 un lien glycosyl phosphatidylinositol (GPI) qui les ancre dans la membrane.²

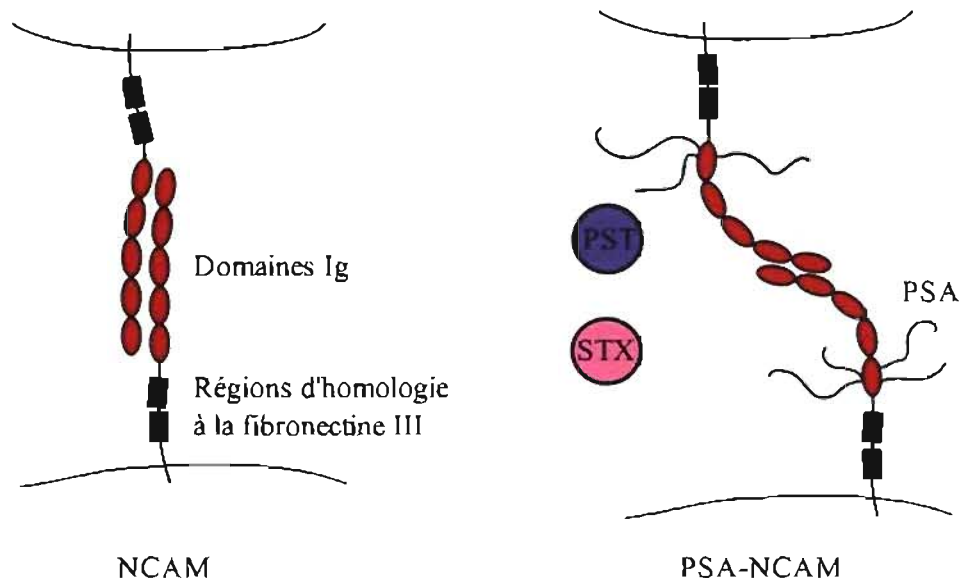


Figure 7 Représentation schématique de la structure de la molécule d'adhésion neuronale NCAM et de sa forme polysialylée (PSA-NCAM). La portion extracellulaire de NCAM comporte 5 domaines immunoglobulines (Ig) et 2 régions d'homologies à la fibronectine III. Les molécules de NCAM peuvent se lier de manière homophile par leur 5 domaines Ig (gauche). L'addition par deux polysialyltransférases (PST et/ou STX) de PSA sur le domaine Ig5 de NCAM réduit l'adhésion entre les deux molécules en ne permettant une adhésion que par les deux premiers domaines Ig (droite). (*Inspiré de²*)

Enzymes de régulation de PSA-NCAM

NCAM est modifiée par deux polysialyltransférases (PST et STX) qui y ajoutent une chaîne de sucre : PSA (Fig. 7). Une chaîne de PSA contient environ 50 monomères et diffère selon l'espèce. C'est un contrôle de l'expression de l'ARNm de ces deux enzymes qui régule l'expression de PSA-NCAM dans le système nerveux. La quantité de PSA présente à la surface cellulaire dépend donc d'une part de la synthèse de PSA-NCAM (elle-même régulée par la transcription des enzymes PST et STX) et du trafic intracellulaire responsable de l'apport de la molécule à la membrane.

Les polysialyltransférases, situées dans l'appareil de Golgi, sont disposées de façon à exposer un court segment cytoplasmique et une large portion intraluminale.^{52,53} Cette portion comprend un domaine structurel et un domaine catalytique. Deux régions homologues du domaine catalytique sont impliquées dans la liaison aux substrats (celui qui donne la chaîne de sucre et NCAM qui la reçoit). Les enzymes polysialyilent les sites de N-glycosylation (deux asparagines) du 5^e domaine Ig (Ig5). L'addition de PSA s'effectue dans l'appareil de Golgi.² NCAM possède 6 sites de N-glycosylation polysialylés par environ 40 (STX) ou 60 (PST) résidus de PSA. Les enzymes, toutes deux présentes dans les mêmes régions, agissent de concert pour réguler l'expression de PSA sur NCAM.

L'expression des enzymes régulatrices de l'ajout de PSA sur NCAM est contrôlée à l'étape de la transcription. De plus, une augmentation de l'expression de PST et STX est associée à une augmentation de la présence de PSA. Leur expression est substantielle dans le cerveau en développement, période où PSA-NCAM est exprimée de façon importante. L'expression des polysialyltransférases diminue après la naissance. PST demeure plus exprimée que STX chez l'adulte. Le même patron d'expression est observé dans le SNE du rat, avec une expression maximale des deux enzymes à 14 et 18 jours du stade embryonnaire (E14-18).⁴⁹

Certains facteurs de transcription promeuvent la transcription des gènes des polysialyltransférases et ainsi l'expression de PSA sur NCAM.⁵² Le niveau d'expression de PSA peut également être régulé de façon non transcriptionnelle. La phosphokinase C (PKC) peut agir en phosphorylant les enzymes régulatrices et ainsi diminuer l'expression de PSA-NCAM. La variation de la concentration intracellulaire de calcium est également liée à l'expression de PSA-NCAM à la surface cellulaire. Cette variation est contrôlée par les récepteurs du *N-methyl-D-aspartic acid* (NDMAR), qui sont donc impliqués indirectement dans le contrôle de l'expression de PSA-NCAM.^{52,54,55}

Rôles de NCAM et PSA-NCAM

Adhésion physique

Plusieurs forces attractives et répulsives agissent de concert pour diriger les neurones et leurs projections vers leurs cibles lors du développement, du remodelage ou de la réparation.^{2,56} Les axones qui poussent ont souvent de longues distances à parcourir.⁵⁶ Ils croissent par étapes, en de courtes élongations à la fois, rejoignant le prochain relais et procédant ainsi jusqu'à la cible principale. Les axones qui poussent empruntent des voies préétablies lors de la croissance de l'embryon.

Des molécules de la matrice extracellulaire, les sémaphorines, les nétrines, les ephrines, les facteurs neurotrophiques et les molécules d'adhésion cellulaires constituent des forces attractives ou répulsives guidant la croissance.^{56,57} Ces molécules peuvent avoir des rôles différents selon leur forme (soluble ou membranaire) ou les récepteurs présents sur la cellule qui migre.⁵⁶

NCAM peut lier une autre molécule de NCAM (liaison homophile) (Fig. 7) ou d'autres molécules comme L1 (molécule d'adhésion de la famille des Ig), le récepteur du *fibroblast growth factor* (FGFR), l'ATP, la laminine et les intégrines (liaison hétérophile).^{2,58} Ces adhésions peuvent subvenir entre des molécules de même (cis) ou différentes (trans) membranes.⁴⁸ Ces liaisons aident les neurones ou les axones à se diriger lors de leur migration pour atteindre leurs cibles précises.^{2,58}

Le PSA ajouté par les polysialyltransférases, chargé négativement, réduit physiquement l'adhésion homophile de NCAM en augmentant la répulsion des molécules entre elles.² Contrairement à une liaison sans PSA, où les 5 domaines Ig sont en contact, une liaison avec PSA ne permet qu'une liaison par les deux premiers domaines Ig créant ainsi un lien plus faible (Fig. 7). Cette réduction de l'adhésion permet une défasciculation des axones et donc une migration plus fine vers leurs cibles.⁵²

Signalisation intracellulaire

NCAM et PSA-NCAM peuvent également agir en tant que molécules de signalisation intracellulaire pour favoriser la croissance axonale.^{2,48} Elles peuvent agir seules pour déclencher une cascade intracellulaire ou de concert avec d'autres molécules signalétiques. Ces cascades mènent ultimement à l'activation de gènes impliqués dans le développement du système nerveux, la croissance et la migration neuronales.

Liaison homophile de NCAM

La liaison homophile de NCAM peut agir intracellulairement en activant la voie de la *mitogen-associated protein kinase* (MAPK) (Fyn/Fak/Ras/MAP kinases).^{2,51} NCAM lie intracellulairement la tyrosine kinase cytoplasmique Fyn, membre de la famille de src (Fig. 8).⁵⁰ Fyn recrute et active ensuite une autre kinase, FAK, par son domaine d'homologie à la kinase src (*src homology domain* - SH2). FAK active finalement Ras ou Raf, kinases en amont de la cascade «Ras-Raf-MEK-Erk» qui mène à la transcription de gènes impliqués dans la croissance neurétique (ex. *cAMP response element binding protein* - CREB).^{48,51} L'inhibition de cette voie empêche la croissance axonale. La liaison homophile de NCAM agit également en facilitant la dimérisation et la phosphorylation du FGFR et ultimement la croissance axonale (Fig. 8).^{2,48,50,51} Ce sont les deux domaines d'homologie à la fibronectine de NCAM qui permettent la liaison des FGFR.⁴⁷ Une fois lié à NCAM, FGFR active la voie de la phospholipase C- γ (PLC- γ), menant à la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP₃) qui causent l'augmentation intracellulaire de calcium.⁵¹

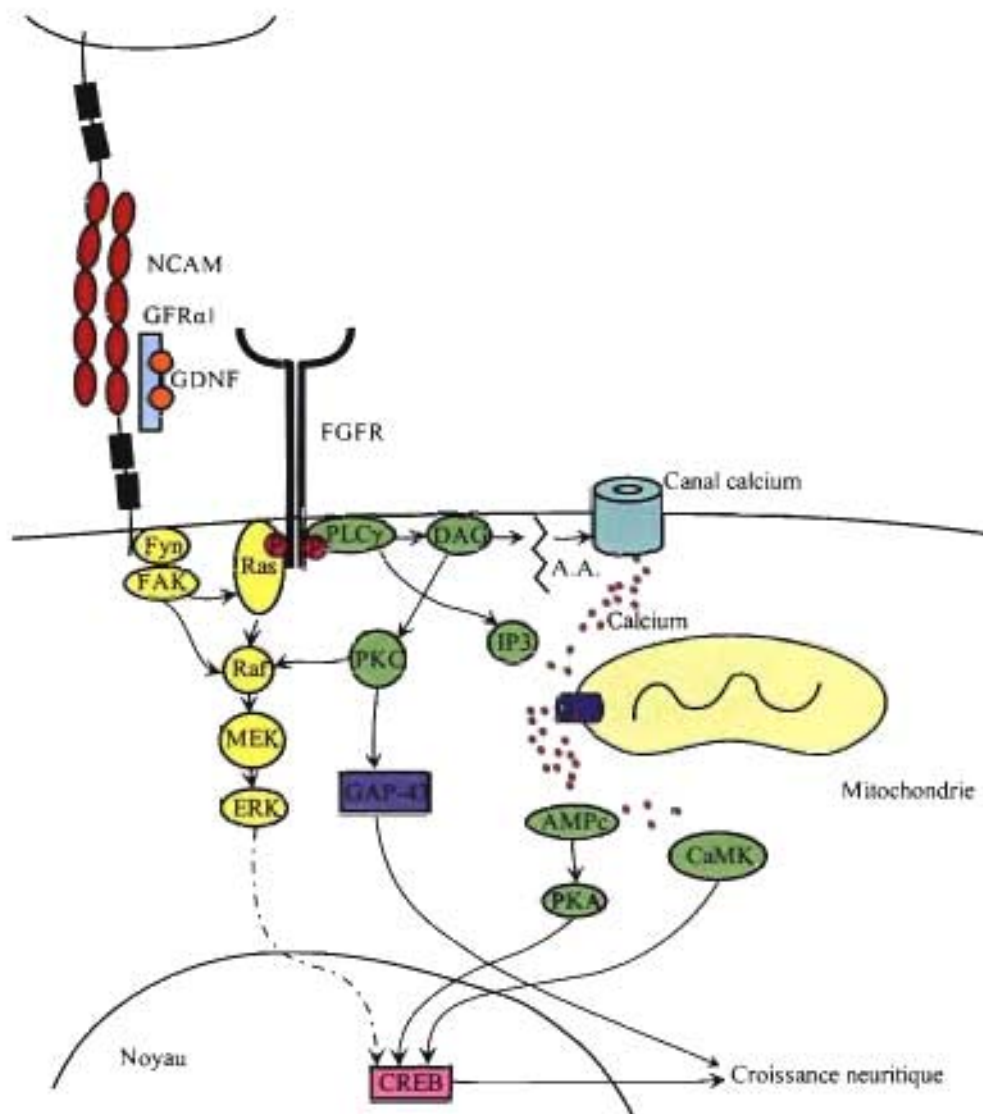


Figure 8 Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires déclenchées par NCAM. Suite à une liaison homophile de NCAM, les tyrosines kinases Fyn et FAK activent la cascade des MAPK (jaune). Également, la liaison homophile déclenche la dimérisation et donc l'activation de FGFR. FGFR recrute et active la cascade des MAPK (jaune) et PLC γ , qui produit DAG et IP $_3$, responsables de l'augmentation intracellulaire de calcium. Ultimement, la voie de la PLC γ , (vert) active la PKC, la PKA et la calmoduline. La cascade des MAPK, la PKA et la calmoduline mènent à l'activation du facteur de transcription CREB. La PKC active la protéine GAP-43. CREB et GAP-43 agissent comme régulateurs de la croissance neuritique. GDNF est capable d'agir sans Ret via la liaison de GRF α 1 et NCAM. Cette liaison active la voie des MAPK. A.A.: acide arachidonique, CREB : *cAMP response element*

binding protein, DAG : diacylglycérol, FGFR : *fibroblast growth factor (FGF) receptor*, GAP-43 : *growth-associated protein-43*, GDNF : *glial-derived neurotrophic factor*, IP₃ : inositol triphosphate, MAPK : mitogen-activated protein (MAP) kinases, P : groupement phosphorylé, PKA : phosphokinase A, PKC : protéine kinase C, PLC γ : phospholipase C- γ . (Inspiré de ^{50,51})

Quand PSA est ajouté à NCAM, un mécanisme similaire à celui qui attire FGFR recrute le récepteur TrkB du *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) à proximité de PSA-NCAM.² Le neurone est donc plus sensible à BDNF, augmentant ses chances de survie. Également, la chaîne négativement chargée de PSA peut favoriser la rétention de BDNF à la surface et de cette façon augmenter les chances de liaison avec son récepteur TrkB.

CREB est un facteur de transcription impliqué dans la neurogenèse associée à la signalisation par NCAM (Fig. 8).⁵¹ La cascade de MAPK, activée par une liaison homophile de NCAM, mène à l'activation de CREB. La phosphokinase A (PKA), activée par une augmentation intracellulaire d'AMPc phosphoryle également CREB dans le noyau. Finalement, suite à la liaison homophile de NCAM et la dimérisation du FGFR, l'augmentation de calcium intracellulaire cause l'activation de la calmoduline (CamK) qui à son tour phosphoryle CREB.

La protéine associée à la croissance (*growth associated protein-43* - GAP-43) est associée à la stabilité des filaments d'actine dans le neurone en croissance.^{2,51} L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire active la CamK qui séquestre GAP-43.⁵¹ GAP-43 ainsi relâchée, PKC peut la phosphoryler pour l'activer à son tour (Fig. 8).

Liaison hétérophilique de NCAM

La liaison hétérophilique de PSA-NCAM avec les intégrines peut favoriser l'activation d'autres récepteurs comme celui du facteur de croissance épithélial (*epithelial growth factor receptor* - EGFR) par exemple.²

Le facteur nucléaire kappa-B (*nuclear factor-kappa B* - NF κ B), un autre facteur de transcription entre autres activé suivant des lésions dans les astrocytes et les

neurones, est impliqué dans la croissance axonale.⁵¹ L'activation de NFκB s'effectue suivant une liaison hétérophilique de NCAM de nature inconnue mais impliquant les protéines de la famille de src, PLCγ, PKC et la CamK.

GDNF peut agir en utilisant NCAM comme récepteur et GFRα1 comme co-récepteur

La voie de signalisation de *Ret/glia derived neurotrophic factor* - GDNF/GFRα1 est impliquée dans la survie et la différenciation neuronale, le contrôle du cycle cellulaire des cellules progénitrices neuronales et la neuritogenèse.^{59,60} Le gène *Ret* code pour une protéine à un seul domaine transmembranaire portant un domaine tyrosine kinase sur sa portion intracellulaire.⁵⁹⁻⁶¹ GDNF couplé au co-récepteur GFRα1 lie RET, causant ainsi l'activation de la kinase. Le gène *Ret* et sa protéine sont exprimés, chez l'humain, tôt après le début de la migration des cellules de la crête neurale.^{59,60} On croit que GDNF, exprimé dans le mésenchyme du tube digestif avant l'arrivée des cellules de la crête neurale vagale, joue un rôle dans l'attraction et la prolifération des cellules migratrices dans l'intestin.^{57,59} La liaison de GDNF et la cascade de signalisation en résultant assurent un apport suffisant en précurseurs neuronaux dans le tube digestif et subséquemment leur bon développement.⁵⁹ L'expression de *Ret* perdure au cours du développement dans les cellules neurales différenciées.⁶⁰ En plus de son rôle dans la différenciation et la survie des cellules en présence de GDNF, *Ret* agit en tant que promoteur apoptotique en absence de GDNF.⁵⁹ GDNF est un facteur neurotrophique composé de deux dimères liés par un lien disulfure le classant comme cousin éloigné du TGF-β.^{59,60,62} Plusieurs autres membres de la famille du GDNF (la neurturine, la perséphrine et l'artémine) signalent par RET, mais en utilisant différentes formes du co-récepteur GFRα.⁵⁹⁻⁶¹ Les membres de la famille du GFRα sont retenus dans des radeaux lipidiques par un groupement GPI et lient GDNF, recrutent le récepteur RET et initient alors une cascade par le traducteur de signal Src.^{60,61}

On a démontré l'interaction possible de GDNF avec NCAM.⁵⁰ Le couplage de ces deux molécules favorise l'attraction du co-récepteur GFR α 1 et l'activation de voies intracellulaires. GDNF peut donc agir sans l'aide du récepteur Ret. Suite à son activation par GDNF, NCAM active la voie Fyn/Fak/Ras/MAPK impliquée dans la croissance axonale (Fig. 8). La liaison de NCAM à GDNF et GFR α 1 diminue l'adhésion homophile de NCAM. GDNF peut donc promouvoir la croissance neuronale sans activer son récepteur traditionnel Ret.

Absence de PSA, NCAM, PST et STX

L'élimination de PSA dans des cellules de l'hippocampe à l'aide d'une endoneuraminidase qui dégrade les chaînes d'acide polysialylique bloque la synaptogénèse et la neuritogénèse.^{45,63} Les souris knock-out pour NCAM démontrent des défauts dans le développement de leur SNC incluant une diminution du volume cérébral et des bulbes olfactifs dus à une migration réduite des précurseurs des neurones olfactifs à partir de la zone ventriculaire.⁴⁸ De plus, des troubles de mémoire, un développement exagéré des îlots de Langherhans du pancréas et une agressivité accrue chez les mâles ont été observés chez ces animaux. On associe l'expression de NCAM et de PSA-NCAM avec l'établissement de la mémoire à long terme. Pendant l'apprentissage, les niveaux de NCAM augmentent dans les zones du cerveau liées à la formation de la mémoire. Similairement, des antagonistes de NCAM ou l'ablation des chaînes de PSA limitent la potentialisation à long terme (LTP).^{48,58} De plus, l'expression de l'ARNm de NCAM est augmentée par la stimulation de récepteurs du glutamate, liant ainsi l'activité neuronale à une modulation de l'expression de NCAM.⁴⁸ Sur le plan digestif, les souris knock-out pour NCAM ne présentent aucune manifestation pathologique. Aucune étude n'a toutefois été entreprise pour vérifier la réaction de ces animaux à des perturbations du SNE. Les souris chez qui l'expression de PST et STX a été réprimée démontrent, en plus des problèmes liés avec l'absence de NCAM, des défauts de développement du cerveau, un retard de croissance post-natal et un taux élevé de mortalité prématurée^{64,104}

Distribution de PSA-NCAM

PSA-NCAM est exprimé dans plusieurs structures du cerveau en développement.⁶⁵ Apparaissant peu après la formation des prémisses du cerveau, la polysialylation de NCAM atteint un maximum peu après la naissance. Chez les rongeurs, l'expression de PSA sur NCAM diminue jusqu'à une absence totale dans le SNC environ trois semaines après la naissance. Dans le SNC adulte, PSA-NCAM est exprimé dans le tractus corticospinal et les projections olfactives ainsi que dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le bulbe olfactif et le cortex piriforme, zones capables de changements structurels dans le cerveau.^{2,55,58,65}

Dans le SNC du rat, PSA-NCAM est exprimé maximale vers la naissance dans les neurones des deux plexi.⁴⁹ On observe une expression à 12 jours du stade embryonnaire (E12) dans le plexus myentérique primordial. L'expression augmente jusqu'à E18, alors qu'environ 75% des neurones expriment PSA-NCAM. Cette expression est maintenue jusqu'à 7 jours après la naissance (P7). L'expression de PSA-NCAM est plus tardive dans le plexus sous-muqueux. Elle atteint toutefois 50% à E18-20. L'expression diminue après P7 pour être totalement absente à P45.

La plasticité neuronale

La plasticité neuronale fait référence à un réarrangement des neurones, de leurs projections, de leurs synapses ou des déterminants de leur activité.⁶⁶ Cette plasticité survient lors du développement ou plus tard, suite à une perturbation ou continuellement dans certaines régions du système nerveux. Ces changements dans l'innervation accommodent une variation dans les stimuli dont les signaux sont intégrés. En plus des réarrangements synaptiques impliqués dans la mémoire (potentiation et dépression à long terme), des réarrangements dans les connexions entre les neurones s'effectuent tout au long de la vie.⁴³ Certaines zones sont même très plastiques, permettant une réorganisation des cartes topographiques dans le SNC suivant le patron de stimulation de ces régions.

PSA et la plasticité dans le SNC

Suite à des lésions du SNC, l'expression de PSA-NCAM est augmentée.² Cette augmentation est fonctionnellement significative, le rétablissement des fonctions étant plus long si l'expression de PSA-NCAM est inhibée. Suite à une coupe de la moelle épinière, la morphologie des épines dendritiques de plusieurs régions impliquées dans la transmission des signaux moteurs change tôt après la lésion.⁴ PSA-NCAM est réexprimé sur les épines des régions impliquées dans la réorganisation. De plus, les axones acquièrent la capacité de croître au travers des cicatrices gliales engendrées par une lésion du CNS.³

La plasticité dans le SNE

Les récentes découvertes de la présence de plasticité dans le SNC et ses similarités importantes avec le SNE portent à croire que ce dernier peut démontrer certaines caractéristiques plastiques.⁵ Suivant certaines perturbations du tube digestif (dénervation, transection/réanastomose, sténose, infection, inflammation), des changements importants surviennent dans le SNE lui permettant de maintenir son activité.

Dénervation

La coupure du lien extrinsèque innervant le SNE fournit un bon modèle pour l'étude de la plasticité du SNE. Les centres supérieurs contrôlent l'activité des circuits intrinsèques du SNE. Après la dénervation, les réflexes intrinsèques du tube digestif subissent un réarrangement et prennent la relève pour assurer le bon contrôle des activités du tractus gastrointestinal. Souvent, une hypersensibilité suit la dénervation, l'apport extrinsèque servant à modérer l'activité des neurones de l'intestin.

Dans des modèles de vagotomie (section du nerf vague), un réflexe dit d'accommodation gastrique permet le retour des réflexes contractiles de l'estomac suivant l'étirement. Ce réflexe est le résultat de réarrangements dans les circuits entériques.

Dans des modèles de dénervation par des agents chimiques (capsaïcine, chlorure de benzalkonium), on observe une élimination de plus de 90% des neurones myentériques.^{5,67} De plus, on note une augmentation de l'immunoréactivité pour la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase* (NADPH diaphorase), VIP et de l'enképhaline (ENK) dans les neurones des deux plexi.⁵ La dénervation induit donc un changement phénotypique des neurones du SNE.

Transection, réanastomose et colostomie

Une résection de l'intestin génère une hyperplasie du tube non-excisé et un changement important de l'activité des neurones moteurs et sécrétoires. Ces changements compensent pour la perte d'un segment de l'intestin. Suite à la réanastomose, les neurones croissent et reforment des connexions pour rétablir l'activité du tube digestif. Les CMM sont en effet rétablis presque en totalité 60 jours après une résection.⁶⁸

Suite à une colostomie, une diminution du volume du corps cellulaire et du nombre des neurones nitrergiques est observée dans le SNE de l'intestin non-détourné.⁶⁹ Ce changement est considéré comme une réponse du SNE à la diminution de l'activité du tube digestif.

Sténose

Des changements de phénotype de la population neuronale surviennent suite à une sténose du tube digestif.⁷⁰ Dans l'iléon hypertrophique, on observe une augmentation du nombre de neurones exprimant VIP, le *pituitary adenylate cyclase activating peptide* (PACAP) et galanine dans le plexus myentérique. Dans le plexus sous-muqueux, on détecte une baisse de l'expression de VIP, une augmentation de la NADPH diaphorase et aucun changement dans l'expression de nNOS.

Dans un modèle animal de sténose, l'hypertrophie de la partie orale au site d'obstruction partielle mène également à la diminution de la population de CIC.^{40,71} Cette diminution est accompagnée de la perte de l'activité contractile lente (contrôlée normalement par les CIC) et de la réactivité à une stimulation

circuits nerveux entériques.⁷¹ L'interruption de l'obstruction résulte en le rétablissement de la population de CIC et de l'activité contractile lente dans le SNE.

Infection

Une infection par un ver plat inoffensif (*Hymenolepis diminuta*) cause une modification importante de l'activité électrique de l'intestin.⁷² Dans le tube digestif infecté de rats à jeun, *H. diminuta* cause une augmentation de l'activité contractile du muscle lisse, une augmentation du temps de transit luminal et la production de courants non-associés à l'activité contractile de l'intestin. Les CMM, présents dans l'organisme à jeun, sont perturbés par l'infection.

Inflammation

Les maladies inflammatoires intestinales et des modèles animaux de ces maladies déclenchent des événements de plasticité dans le SNE pendant et suite à l'inflammation. Dans l'intestin enflammé, un changement d'effectif, d'excitabilité et d'expression de neurotransmetteurs survient dans les différentes populations neuronales.⁵ (Voir p. 46 *Influence de l'inflammation intestinale sur le SNE*).

Maladies inflammatoires intestinales et SNE

Les maladies inflammatoires intestinales comprennent la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse.⁷³ Bien qu'assez similaires dans leurs symptômes, les deux maladies sollicitent indûment différentes réponses du système immunitaire. Pour étudier, comprendre et traiter ces maladies, plusieurs modèles animaux ont été développés, chacun possédant des caractéristiques intéressantes pour l'étude d'un aspect des maladies inflammatoires intestinales. Ces maladies ont un effet très important sur la fonction du tube digestif, entre autres par l'atteinte du SNE. Le SNC a lui aussi un effet sur le comportement du système immunitaire entérique en réponse à des conditionnements, du stress ou même des émotions.

Les maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires intestinales sont des désordres inflammatoires du tube digestif se manifestant généralement durant l'enfance.⁷⁴ Les symptômes incluent une perte de poids, une diarrhée sanguinolente accompagnée de crampes abdominales, résultats directs du processus inflammatoire.⁷³ Les régions touchées de l'intestin présentent une inflammation transmurale chez les patients atteints de la maladie de Crohn et une atteinte superficielle de la muqueuse chez les patients atteints de la colite ulcéreuse. L'hypothèse étiologique la plus souvent acceptée est celle voulant que les maladies inflammatoires intestinales soient une réaction immunitaire démesurée contre des bactéries résidentes normales du tube digestif chez des patients génétiquement susceptibles.⁶ Des facteurs environnementaux agissent dans le déclenchement et le développement de la maladie.

Plusieurs gènes sont associés aux maladies inflammatoires intestinales

Le gène *NOD2/CARD15* (*non-obese diabetic 2 / caspase recruitment domain protein 15*), situé au locus IBD1 sur le chromosome 16 est associé à la maladie de Crohn.⁷⁴ Les 12 exons de *NOD2/CARD15* codent pour une protéine intracellulaire qui agit dans la réponse de l'hôte aux pathogènes en activant des

voies apoptotiques et de NFκB. La protéine est composée de deux domaines de recrutement de caspases (CARD1 et 2), d'un domaine de liaison aux nucléotides et d'un domaine riche en leucines. C'est ce domaine riche en leucine qui lie le muramyl dipeptide, composant actif des peptidoglycans formant la paroi cellulaire des bactéries.⁶ Le domaine riche en leucines recrute une sérine/thréonine kinase en amont d'une cascade d'activation de NFκB.⁷⁴ Dans les différents types de mutants de *NOD2/CARD15*, exprimant une protéine tronquée et inactive, la liaison d'un antigène bactérien ne permet pas une réponse immunitaire adéquate, pouvant contribuer ainsi au développement d'une inflammation exagérée.⁶ La présence de plus d'une mutation chez le même patient est associée à un âge plus bas au déclenchement de la maladie, plus de strictions et de granulomes et une diminution de l'incidence de la maladie dans le côlon gauche et le rectum.⁷⁵

Des variants fonctionnels d'autres gènes sont associés aux mutations du gène *CARD15*.⁶ Les gènes qui codent pour *OCTN1* et *OCTN2* (des transporteurs de cations organiques et de la carnitine) et *DLG5* (une protéine d'échafaudage associée à l'intégrité épithéliale) sont souvent mutés dans la population de patients atteints de la maladie de Crohn portant une mutation pour *CARD15*. Le gène *MDR1*, codant pour un autre transporteur transmembranaire est également associé à la maladie de Crohn.

Les gènes impliqués dans la maladie de Crohn sont donc liés à la réponse immune innée, à l'intégrité de la barrière épithéliale ou à l'élimination de bactéries.

L'inflammation dans les maladies inflammatoires intestinales est le résultat d'une fonction immunitaire déficiente

Normalement, le système immunitaire entérique tolère les multiples antigènes issus de la nourriture et des bactéries commensales transigeant dans le tube digestif.⁷³ Une réponse immune n'est engendrée qu'envers les antigènes pathogènes. Les maladies inflammatoires intestinales seraient causées par la perte de la tolérance envers les bactéries normales et les antigènes provenant de

la nourriture. Bien que les mécanismes immunitaires engendrés dans les maladies inflammatoires intestinales soient bien décrits, les antigènes responsables du déclenchement de la maladie restent inconnus.⁷⁴

Les adjuvants bactériens, substances reconnues par le système immunitaire inné (lipopolysaccharides, peptidoglycans, flagelline et ADN non méthylé), lient différents récepteurs responsables de la reconnaissance de patrons bactériens dans le système immunitaire (*Toll like receptors* - TLRs).⁶ Une augmentation de l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires est alors observée. Les TLRs activent NFκB et les MAPK, qui stimulent à leur tour la transcription de gènes pro-inflammatoires.

Des molécules d'adhésion cellulaire, dont l'expression est accrue dans les maladies inflammatoires intestinales, permettent aux cellules inflammatoires de s'attacher à l'endothélium aux foyers d'inflammation et sont utilisées pour leur extravasation et leur migration jusqu'aux sites de production des chimiokines.

Les molécules pro-inflammatoires sont généralement produites par les monocytes et les neutrophiles polymorphonucléaires ayant migré au foyer d'inflammation. Les cellules résidentes de la paroi du tube digestif (macrophages, cellules épithéliales) ont une réactivité réduite aux bactéries pathogènes, vu une désensibilisation des récepteurs de reconnaissance des antigènes bactériens (TLRs).

La réponse adaptative du système immunitaire dans la maladie de Crohn diffère de celle de la colite ulcéreuse.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont activées par la rencontre et l'ingestion d'un agent pathogène dans leur tissu attiré.⁷⁶ Suite à la phagocytose du microbe, la cellule migre vers un tissu lymphoïde, où elle présente l'antigène à des lymphocytes T naïfs. La réponse dépend du type de pathogène, qui déclenche la sécrétion de diverses cytokines et donc l'activation de différents sous-types de lymphocytes T.^{6,76}

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, la réponse adaptative implique les cytokines produites par les lymphocytes T *helper* de type 1 (T_H1).⁶

Les cellules dendritiques sont majoritairement responsables de l'activation de cellules T naïves. À la suite de leur activation par la rencontre d'un adjuvant bactérien dans la *lamina propria* ou les plaques de Peyer, les cellules dendritiques migrent dans les ganglions lymphatiques caudaux et mésentériques où elles stimulent les cellules T. La stimulation des lymphocytes T s'effectue par des molécules co-stimulatoires, des cytokines et la présentation de l'antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chacun de ces signaux contribue au phénotype et à l'activation des cellules T. La réponse de type T_H1 est généralement médiée par les cellules présentatrices d'antigènes activées qui produisent l'interleukine 12 (Il-12). L'Il-12 provoque à son tour la production de l'interféron- γ (IFN- γ). Les interférons sont impliqués dans le développement de la réponse adaptative du système immunitaire.⁷⁶

De plus, on retrouve chez les patients atteints de la maladie de Crohn une réponse de type T_H17.^{6,77,78} Les cytokines Il-6, TGF- β et Il-23 sécrétées par les cellules immunitaires responsables de la réponse innée et les cellules présentatrices d'antigènes sont responsables de la production d'Il-17.⁶ L'Il-17 induit l'expression de chimiokines, facteurs de croissance, et molécules d'adhésion, responsables de l'attraction de neutrophiles et de la granulopoïèse.⁷⁸

On retrouve une réponse T_H1 avec l'implication d'une réponse T_H2 défectueuse chez les patients atteints de la colite ulcéreuse.⁷³ Cette réponse est caractérisée par la présence d'Il-4, d' Il-5 et d'Il-10.

Les modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales

Les modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales peuvent être classés en quatre catégories : Les modèles de colite spontanée, inductible, de transfert et les animaux manipulés génétiquement (Tableau II).⁷

Les modèles animaux de colite agissent par croisements impliquant des animaux de souches développant naturellement une colite passagère (modèles de colite spontanée), déclenchement de réponses inflammatoires indues (modèles de colite inductible) ou par modification d'une voie de régulation de

l'inflammation (modèles de souris knock-out, de transfert adoptif ou transgéniques).

Les modèles inductibles de colite comme le TNBS sont relativement simples, peu coûteux et très utiles dans l'étude d'événements précis du développement de l'inflammation.⁷⁹ Le TNBS est un haptène, petite molécule organique qui, lorsque jumelée de façon covalente avec des protéines tissulaires résidentes, déclenche une réponse immunitaire.^{8,76} Lorsque injecté directement dans l'intestin jumelé à de l'éthanol qui détruit l'intégrité de la barrière muqueuse, le TNBS déclenche une réponse du système immunitaire.^{7,8} La réponse n'est pas homogène dans chaque animal, mais la présence de granulomes avec infiltration de cellules inflammatoires dans chaque couche du tube digestif est constante.⁷ Certains animaux développent même une colite chronique. Les macrophages produisent dans ce modèle de grandes quantités d'Il-12 et les lymphocytes d'IFN- γ et d'Il-2, une réponse de type T_H1 établissant ce modèle comme un important modèle de la maladie de Crohn.

Tableau II Principaux modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales. (Tiré de ⁷)

Type de modèle	Nom	Animal	Mécanisme	Réponse	Référence
Spontané	SAMP1/Yit	Souris	IFN- γ et TNF	Semblable à Crohn	⁸⁰
	CH3/HeJBir	Souris	Déficiences en Il-10	T _H 1	⁸¹
Inductible	TNBS	Rat	Haptène	T _H 1	⁸
	Oxazolone	Souris	Adjuvant	T _H 2	⁸²
	DSS	Souris	Système immunitaire inné		⁸³
Transfert inductif	CD4+/CD45RB ^{high}	Souris	Sécrétion de cytokines proinflammatoires	T _H 1	⁸⁴
Knock-out	Il-2	Souris	-	T _H 1	⁸⁵
	Il-10	Souris	-	T _H 1	⁸⁶
	3'UTR de TNF α	Souris	Impossibilité de régulation par Il-2	Semblable à Crohn	⁸⁷
Transgénique	Il-7	Souris	Surexpression d'Il-7	Semblable à CU	⁸⁸

IFN- γ : interféron- γ , TNF : *tumor necrosis factor*, Il-2/7/10 : interleukine-2/7/10, T_H1/2 : T *helper* 1/2, DSS : dextran sulfate de sodium, UTR : 3' *untranscribed region*, CU : colite ulcéreuse.

Liens entre le SNE et le système immunitaire

Le système digestif est tous les jours en contact avec une charge antigénique importante.^{22,89} Les barrières physiques et chimiques offertes par l'épithélium ne suffisent pas à empêcher tous les antigènes provenant de la diète, de bactéries, virus ou toxines de pénétrer. Le système immunitaire entérique est donc tolérant pour certains antigènes inoffensifs. Les événements inflammatoires ont un effet sur la réponse physiologique régie par le SNE. À l'inverse, le SNE a également un effet sur le système immunitaire, permettant un ajustement de la réponse immune à des stimuli lumineux. La modulation réciproque de l'inflammation et du SNE et le remodelage du SNE suite à certaines perturbations témoigne de la plasticité et de la capacité d'adaptation de ce dernier.

Le SNE influence le système immunitaire

Des projections neuronales provenant du SNC et ayant une influence sur le système immunitaire entérique innervent les mastocytes.^{15,22,90} Les mastocytes peuvent relâcher leurs granules suivant un conditionnement classique ou un stress.^{22,90} Localement, une activation soutenue des fibres afférentes libère une quantité importante de sP et de *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), résultant en une activation des mastocytes et l'inflammation.¹⁵ De plus, les plaques de Peyer sont innervées par les projections de neurones entériques.¹ Les lymphocytes de la *lamina propria* de la muqueuse portent des récepteurs pour les neurotransmetteurs entériques.

Le système immunitaire influence le SNE

Advenant l'infiltration d'un agent pathogène, le système immunitaire inné est la première ligne de défense.^{22,76} Une communication paracrine transmet un signal du système immunitaire sollicité au SNE qui déclenche une réponse motrice et sécrétoire appropriée.²² Cette réponse se manifeste par des longues et intenses contractions et une sécrétion accrue d'eau et de mucus sert à expulser le pathogène ou la toxine. Dans l'intestin, elle cause souvent douleurs abdominales et diarrhée. Dans le tractus gastrointestinal supérieur, cette réponse est responsable du réflexe de vomissement.

Plusieurs types de cellules sont impliqués dans la sécrétion paracrine contrôlant une réponse du SNE à un pathogène (lymphocytes, neutrophiles, macrophages, mastocytes). Les mastocytes, lors de leur dégranulation suite à la rencontre d'un antigène, relâchent plusieurs messagers comme la 5-HT, l'histamine et les leukotriènes.^{22,26} Ces facteurs déclenchent tous un certain type de programme d'activation neuronal dans le SNE.²² L'histamine est par exemple responsable de l'augmentation de l'excitabilité des neurones IPANs.²⁶ La modification du patron d'activation de certains types de neurones peut jouer un rôle important dans la dysfonction observée dans les maladies inflammatoires intestinales.

Influence de l'inflammation intestinale sur le SNE

Dans les maladies inflammatoires intestinales, l'inflammation a un effet sur la fonction du SNE.¹¹ Des changements du fonctionnement des micro-circuits entériques contribuent à la dysfonction digestive associée aux maladies inflammatoires intestinales.

Perte de neurones

Suite à une colite induite expérimentalement, il y a perte de neurones importante dans les deux plexi.^{11,91-93} Vingt-quatre heures après l'induction d'une colite par le TNBS, on remarque une perte allant jusqu'à 50% des neurones des deux plexi.⁹³ On observe également lors de cette période une augmentation importante du nombre d'axones, laissant supposer un mécanisme compensatoire. La perte de neurones est non spécifique à un seul type de neurones et perdure jusqu'à 56 jours après la résolution de l'inflammation.⁹²

Changement dans l'expression des neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs exprimés par les neurones et cellules entéroendocrines du SNE sont également affectés pendant et après l'inflammation colique.^{10,12,94,95} Ces changements dans les neurotransmetteurs signifient une modification du message des neurones ou de réactivité des microcircuits et peuvent donc fournir une explication aux désordres de motilité, d'absorption et de sécrétion rencontrés par les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales.

Chez les patients atteints de la colite ulcéreuse, on observe une diminution de l'expression de ChAT, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur caractéristique des neurones excitateurs.¹² Une augmentation de l'expression du neurotransmetteur sP laisse croire à un changement des neurones entériques cholinergiques vers un phénotype pro-inflammatoire. Chez les rats traités avec le TNBS, on observe un changement de phénotype impliquant une diminution de moitié de l'expression des récepteurs de neurotrophines p75 et trkA.⁹¹ De plus, on observe une baisse de l'expression de ChAT et calbindine (marqueurs des neurones sensoriels) et une augmentation

de l'expression de nNOS, un marqueur des neurones inhibiteurs. Ces variations portent à croire qu'un déséquilibre entre les populations de neurones pourrait jouer un rôle dans la dysfonction gastrointestinale durant les maladies inflammatoires intestinales.

Hyperexcitabilité des neurones sensoriels

Dans le modèle TNBS de colite, les caractéristiques électrophysiologiques des deux types de neurones du plexus sous-muqueux sont modifiées.¹⁹

Les neurones de type AH déclenchent plus de PPSE dans l'inflammation. Ils deviennent alors hyperexcitables, déclenchant plus de potentiels d'action de plus basse amplitude. Les neurones AH dans la colite ont également une hyperpolarisation de plus faible amplitude, contribuant ainsi à l'hyperexcitabilité de la cellule. Les neurones de type S ne changent pas leur patron d'activation suivant l'inflammation, mais démontrent une augmentation significative du nombre de PPSE.¹⁹ La plasticité induite par l'inflammation est donc limitée à la transmission synaptique pour les neurones S, mais implique des changements importants dans le degré d'excitabilité chez les neurones AH.

La signalisation par la sérotonine est altérée dans la colite

Les cellules entéroendocrines subissent les dommages causés par l'inflammation colique. On remarque chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales et les modèles animaux de ces maladies une diminution de l'expression du transporteur de la sérotonine (*serotonin reuptake transporter* - SERT) dans les cellules CEC.¹⁰ Sans SERT, le transit gastrointestinal est ralenti, la quantité de fèces est réduite et la sensibilité de l'intestin à un stimuli nociceptif est diminuée.⁹⁶ Dans la colite, la 5-HT qui transmet le signal luminal aux neurones sensoriels des systèmes nerveux entériques et centraux s'accumule dans la muqueuse, n'étant pas réabsorbée vu la diminution de l'expression de SERT.¹⁰ Cette diminution et la présence accrue de 5-HT en résultant suggère une dysfonction de signalisation et une explication pour la dysmotilité observée dans les maladies inflammatoires intestinales.^{10,95,96}

Hypothèses et objectifs de l'étude

Le SNE comporte plusieurs similitudes avec le SNC. Des réflexes intrinsèques perçoivent les stimuli et permettent une réponse appropriée de l'organisme. Plusieurs acteurs garantissent l'établissement de ces complexes réseaux neuronaux. Des molécules d'adhésion comme NCAM et sa forme polysialylée (PSA-NCAM) sont exprimées au cours du développement du SNC et du SNE et assurent le guidage des neurones et de leurs axones vers leurs cibles. Dans le SNC adulte, PSA-NCAM n'est exprimé que dans certaines zones plastiques du cerveau. Dans le SNC, on observe une réexpression de PSA-NCAM suite à des lésions (ischémie, convulsions). Dans le SNE, l'expression postnatale de PSA-NCAM diminue jusqu'à une absence totale chez l'adulte. Le SNE démontre une capacité de remodelage et de plasticité suite à plusieurs types de perturbations.

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle PSA-NCAM est réexprimée dans le SNE suivant une inflammation colique. Nous pensons également que cette réexpression est associée avec une augmentation de l'activité des enzymes régulatrices PST et STX.

Les objectifs de cette étude étaient donc de (1) quantifier l'expression de PSA-NCAM dans le SNE du rat adulte suite à l'induction d'une colite par le TNBS, (2) de déterminer la population précise de neurones réexprimant la molécule d'adhésion et (3) vérifier s'il existe une variation dans l'expression de l'ARNm des enzymes régulatrices de PSA-NCAM suite à la colite.

Manuscrit

PSA-NCAM reexpression in a subset of myenteric neurons following TNBS colitis in rats

Philippe Ouellet*, Cindy Gauthier*, Catherine Rhéaume*, Dorothée Dal Soglio*†, Christophe Faure*‡

Sainte-Justine Hospital Research Center, University of Montreal, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada.

† Department of Pathology, Sainte-Justine Hospital, University of Montreal, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada.

‡ Division of Gastroenterology, Sainte-Justine Hospital, University of Montreal, 3175 Côte Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author:

Christophe Faure

Division of Gastroenterology and Nutrition

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine

Montréal, Québec, Canada

H3T 1C5

Tel: [information retirée / information withdrawn]

Fax: [information retirée / information withdrawn]

Email: [information retirée / information withdrawn]

Abstract

The polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule (PSA-NCAM) expression in the enteric nervous system (ENS) is developmentally regulated with a high expression during embryogenesis and a complete down-regulation in adults. In the adult brain, PSA-NCAM is involved in neuronal networks repair and is reexpressed after neuronal injury. In inflammatory bowel diseases, the ENS plays a critical role. This study was undertaken to verify if colonic inflammation is associated with a reexpression of PSA-NCAM in the adult rat ENS. We also determined the phenotype of the PSA-NCAM immunoreactive cells and quantified the mRNA expression of the PSA-NCAM regulating enzymes: PST and STX. Colitis was induced by intra-colonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Control animals were injected with ethanol or saline. Colons were collected 3, 7 and 21 days after injection. Double immunofluorescences were performed on wholemount preparations. Markers for neurons (PGP9.5), excitatory (choline acetyltransferase) and inhibitory neurons (neuronal nitric oxide synthase), and intrinsic primary afferent neurons [IPANs] (calbindin) were used in combination with an antibody to PSA-NCAM. Quantitative real-time PCR was performed for the PST and STX. The most severe colonic inflammation was seen after 3 days. At this stage, PSA-NCAM was reexpressed by $2.2 \% \pm 0.3$ of the PGP9.5+ neurons ($p < 0.0001$ vs. controls). $92 \% \pm 2$ of the PSA-NCAM+ cells were calbindin immunoreactive and $86 \% \pm 2$ were immunoreactive for choline acetyl transferase. No significant variation in PST and STX mRNA expression was observed at any stage. PSA-NCAM is reexpressed in IPANs of the myenteric plexus following TNBS-induced colitis in the adult rat. PSA-NCAM reexpression may participate to mechanisms that enhance intrinsic sensory reflex activity during intestinal inflammation.

Keywords: Enteric nervous system, plasticity, colitis, PSA-NCAM, intrinsic primary afferent neurons

Introduction

The neuronal adhesion cell molecule (NCAM) is member of the immunoglobulin (Ig) superfamily and is ubiquitously expressed in the nervous system.¹ NCAM mediates homophilic and heterophilic adhesion as well as *cis* and *trans* interactions² and functions not only in adhesive interactions, but also as a cell surface receptor.²⁻⁴ The polysialylated form of NCAM (PSA-NCAM) results from a post-translational modification of NCAM.⁵ Linear homopolymers of α 2,8-linked sialic acid residues are attached to the fifth Ig domain of the extracellular moiety of NCAM. This modification is dependent on two sialyltransferases, PST⁶ and STX.⁷ Polysialylation reduces the adhesive properties of NCAM⁵, increases intermembrane repulsion⁸, and is involved in nerve defasciculation and axon branching.⁹ Synaptic plasticity in the hippocampus is also highly dependent on PSA-NCAM expression.^{10, 11} PSA-NCAM has been demonstrated to be reexpressed in the CNS following neuronal injury such as ischemia¹², seizures¹³ and spinal cord transection.¹⁴ PSA-NCAM is predominant in the developing embryonic brain and the amount of PSA declines progressively after birth.⁵ In the adult brain, only a minor fraction of NCAM remains in its polysialylated state in restricted areas on neurons showing ongoing neurogenesis, cell migration, axonal outgrowth and synaptic plasticity.¹⁵ In the enteric nervous system (ENS), PSA-NCAM expression is similarly developmentally regulated. PSA-NCAM is highly expressed in enteric neurons during fetal development until postnatal day 14 (P14), when down-regulation of expression begins to occur mainly on submucosal neurons. In adults, there is virtually no expression of PSA-NCAM on enteric neurons, enteric glial cells or muscle cells.

Plasticity and capacity of repair is revealed in the adult ENS after direct or indirect physical injury.¹⁶ Regrowth and reconnection of axons occurs after intestinal transection and reanastomosis.¹⁷ Enteric neuronal plasticity can also be observed after diversion colostomy¹⁸ or in the hypertrophic ileum subsequent to a partial ileal obstruction.¹⁹ Similarly, in chronic inflammatory

bowel diseases such as Crohn's disease or ulcerative colitis and in animal models of colitis, major anatomical and functional changes in enteric innervation have been detected (for a review see²⁰).

Given the possibility of reexpression of PSA-NCAM in the CNS following injury, and the ENS capacity for plasticity and repair, this study was designed to test the hypothesis that PSA-NCAM reexpression is part of the response to TNBS-induced colitis in the rat ENS. We sought to quantify the mRNA of the 2 sialyltransferases STX and PST. We identified that the intrinsic primary afferent sensory neurons (IPAN) specifically reexpress PSA-NCAM in the TNBS-induced colitis.

Material and methods

Induction of colitis

For all experiments, adult (250g) male and female Sprague-Dawley rats were used (Charles River, Montreal, Canada). Rats were housed 3 per cage on a 12:12 light-dark cycle and fed *ad libitum*. Colitis was induced in anesthetized rats (Isoflurane 3%; 02026635, Abbott, Montreal, Canada) by instillation of TNBS (20 mg; P2297, Sigma, St-Louis, MO, USA) diluted in ethanol (50%) from an 8 French catheter inserted at 7 cm from the anus. Control rats were injected with vehicle (50% ethanol, 0.5 ml) or saline (0.9% NaCl, 0.5 ml). Rats were sacrificed 3, 7 or 21 days following induction of colitis (T3, T7 and T21 respectively) in a CO₂ chamber. Three to 6 experiments were conducted in each experimental group. The Ste-Justine Hospital Animal Care and Use Ethics Committee (*Comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche - CIBPAR*) approved all procedures.

Tissue preparation

Macroscopic assessment of colitis severity was performed immediately following sacrifice, after opening of the abdominal cavity. The entire colon was collected and flushed in cold phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4, 0.1M). The colon was opened longitudinally, following the mesenteric boundary. Inflamed sections (0.5 cm²) of the colon were either fixed in neutrally buffered formaldehyde (10%), snap frozen at -80°C or plunged in RNAlater RNA Stabilization Reagent (76104, QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) for histological scoring, myeloperoxidase (MPO) activity assessment and mRNA extraction, respectively. The rest of the inflamed sections were fixed in Dubosq-Brazil fixative (300 ml 80% ethanol, 120 ml 37% formaldehyde solution [BP531500, Fisher, Ottawa, ON, Canada], 30 ml Glacial acetic acid [A-6283, Sigma, St-Louis, MO, USA], and 40 ml picric acid [1.2% w/v; 5860-16, Ricca Chemical Company, Arlington, TX, USA]) for 3 h. Fixed tissue was

conserved at 4°C in PBS. Wholemounds were prepared by micro-dissection of colon sections. Mucous and submucous layers were discarded. Circular muscle was removed from the myenteric plexus. The latter was therefore left bare on the longitudinal muscle layer.

Assessment of colitis severity

Macroscopic evaluation of colitis severity was performed on a 14 points scale. Hyperhemia, ulcerations, strictions, adhesions, and thickening were considered.^{36,37} External signs of disease (fever, sweating, loose and/or bloody stools, and weight loss) were assessed during the period following the injection and also included in the macroscopic score. A pathologist performed blind histological assessment of the severity of the colitis. Specimen were dyed conventionally with hematoxilin-eosin and scored on a 13 points scale. Criteria considered for histological scoring were the intensity and activity of the inflammation, the disruption of mucosal architecture, presence of cryptic abscesses, ulceration and mucosecretion as well as signs of chronic inflammation.

Myeloperoxidase activity assessment

The method used followed that described by Bradley³⁸ with subtle modifications. Approximately 100mg of tissue was homogenized in 1 ml of buffered sodium phosphate solution (50 mM, pH 6,0). Following 3 freeze-thaw cycles, the samples were centrifuged (10 000 RPM) for 15 min at 4°C. Supernatant was discarded and the pellet resuspended in 500 µl of hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB; 0,5% w/v in buffered phosphate solution). This solution was sonicated on ice three times for 10 s, centrifuged again for 15 min at 4°C and O-dianisidine dihydrochloride (0.167 mg/ml with 0.0005% hydrogen peroxide) was added to a 1:25 dilution of the obtained supernatant in buffered phosphate solution. Pure MPO from human leukocytes (M6908, Sigma, St-Louis, MO, USA) was used as a standard. Absorbance variations were measured at 450 nm every 30 s for a total of 6 min (DU® 640

spectrophotometer, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Dosage of proteins was conducted with Bio-Rad Protein Assay (500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Double immunofluorescences on wholemount preparations

Fixed and dissected wholemounts were disposed on slides in humid chambers. Preparations were washed 10 min and incubated 1 h with PBS containing (1) X-100 Triton (0.1%: S-5340, Sigma, St-Louis, MO, USA) and normal goat serum (10%: G9023, Sigma, St-Louis, MO, USA) or (2) X-100 Triton (0.1%) and donkey serum (10%; D9663, Sigma, St-Louis, MO, USA). The solution was removed and specimens were then incubated overnight with PBS containing (1) X-100 Triton (0.1%), normal goat serum (4%) or (2) X-100 Triton (0.1%), donkey serum (4%), and the primary antibody against PSA-NCAM combined with a phenotypic marker (s100b, calbindin, ChAT or nNOS) (Table I). These preparations were washed three times for 10 min in PBS and then incubated for 2 h at 4°C with secondary antibodies (Table I). Tissue sections were rinsed three times for 10 min in PBS and incubated for 1 h at room temperature with a 1:2000 dilution of indocarbocyanine (Cy3)-conjugated streptavidin (016-160-084, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Tissue sections were rinsed three times for 10 min in PBS, dried and mounted for light microscopy using Fluoromount-G (17984-25, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Immunoreactive cells were counted using a microscope with epifluorescence (Carl Zeiss, Toronto, ON, Canada).

Quantitative real-time PCR

Extraction of RNA from inflamed tissue preserved in RNAlater was performed using QIAGEN RNeasy mini kit (74104, QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) including a DNases neutralizing step (RNase-Free DNase Set, 79254, QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's recommendations. Reverse transcription was conducted using total RNA (4 µg) as template, Oligo(dT) non-specific primers (18418-012, Invitrogen,

Burlington, ON, Canada), dNTP Set (10 mM; 10297-018, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and Superscript II reverse transcriptase (18064-022, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Reverse transcription was conducted following product specifications. Quantitative real-time PCR was performed using primers binding exons of the PST and STX genes (PST forward primer: GCAGTTTCAAGCCTGGTGAT; PST reverse primer: GGTGAAACTTCAGGCAGGAG; STX forward primer: GTGGATACCTGCCTTCATGG; STX reverse primer: CATGGTGCTTCAGGATGAGA) and of the normalizing gene β -actin (forward primer: AACGTTGACATCCGTAAAGACCT; reverse primer: GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC) (Alpha DNA, Montreal, Canada). Primers were designed using the Primer3 Software (Whitehead Institute, Boston, MA, USA). Specificity of the primer sequence was verified with a BLAST search (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA). The amplification was performed in a Mx3000p QPCR thermocycler (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using 1X concentration of the 2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (204143, QIAGEN, Mississauga, ON, Canada), forward and reverse primers (0.3 μ M), uracyl DNA glycosylase (UNG; 0.5 U/rx) and the unknown sample (PST: 2 μ g / μ l; STX: 50 μ g/ μ l; β -actin: 2 μ g/ μ l). Expression of β -actin was quantified in every sample. *No template controls* (containing water instead of sample) and *no RT controls* (containing mRNA having undergone retrotranscription without reverse transcriptase) were included in each trial. Triplicate experiments were conducted for each sample. The cDNA encoding PST or STX was treated with UNG (50°C for 2 min, 95°C for 15 min) and amplified for 45 cycles (denaturation: 94°C for 15 s, annealing: 59°C [PST] or 58°C [STX] for 30 s and elongation: 72°C for 30 s).

Statistics

Statistical analysis and graphs were performed using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Chi square tests were used to compare PSA-NCAM expression in the PGP 9.5+ and s100b+ populations of

the different groups. Computations of the relative transcript expression were achieved using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ technique.³⁹ Mann-Whitney t tests were used to compare the inflammation scores, MPO activity and PST / STX transcript expression of the different groups. Values are expressed as the mean \pm SEM.

Results

TNBS induces severe inflammation in adult rats 3 days following instillation

Severity of colitis was assessed macroscopically, histologically and through MPO activity at T3, T7 and T21 in each group (Fig. 1). Inflammation was maximal 3 days after induction of colitis and decreased to reach virtually absent levels at 21 days. The ethanol controls showed lightly inflamed tissues with no ulceration. The saline controls displayed no significant inflammation. MPO activity followed a similar pattern, with a maximum at T3 (18 ± 4 U/mg protein), decreasing until complete absence at T21 (2.2 ± 2.1 U/mg protein, $p < 0.05$).

PSA-NCAM is reexpressed specifically in myenteric neurons following TNBS-induced colitis

PSA-NCAM expression was verified and quantified immunologically in wholemount preparations of rat myenteric plexus. Expression was verified in neuronal and glial populations and compared between TNBS-treated and control animals. PSA-NCAM was reexpressed exclusively in neurons (PGP 9.5+ cells) (Fig. 2). All cells that displayed immunoreactivity for S100b, a glial marker, were negative for PSA-NCAM. At T3, $2.2\% \pm 0.3$ of PGP 9.5+ cells displayed immunoreactivity for PSA-NCAM (Fig 3). The ethanol treated animals displayed significantly lower immunoreactivity for PSA-NCAM than TNBS treated animals ($0.8\% \pm 0.1$; $p < 0.01$) but significantly higher expression of PSA-NCAM than saline controls. The myenteric neurons of saline treated animals were all negative for PSA-NCAM immunoreactivity. PSA-NCAM expression in TNBS-treated animals also decreased significantly between groups (T3 vs. T7, T7 vs. T21, T3 vs. T21) to a non-significant difference at T21 when compared with saline controls.

The neurons reexpressing PSA-NCAM are immunoreactive for calbindin and ChAT

Double immunofluorescences were used to determine the neuronal phenotype of the PSA-NCAM reexpressing cells. Neurons positive for PSA-NCAM displayed immunoreactivity for calbindin and ChAT, but not for nNOS (Fig. 4). The cells displaying PSA-NCAM immunoreactivity were calbindin immunoreactive at $92\% \pm 2$ and ChAT immunoreactive at $86\% \pm 2$. PSA-NCAM reexpressing cells showed virtually no immunoreactivity for nNOS.

Transcripts of PSA-NCAM regulating enzymes are not upregulated in the rat's colon following TNBS colitis

PSA-NCAM regulating enzymes transcript expression was quantified using QRT-PCR (Fig. 5). No significant variations were detected compared to control in the expression of PST or STX at any stage.

Discussion

The aim of these experiments was to measure the expression of PSA-NCAM and the mRNA of its regulatory enzymes in the myenteric plexus of the rat ENS following colonic inflammation. We have demonstrated that a subset of calbindin and choline acetyltransferase immunoreactive myenteric neurons are able to reexpress PSA-NCAM during the acute and most severe inflammatory phase after TNBS induction of colitis in adult rats. We did not find any variation in the mRNA expression of PST and STX, the two enzymes responsible of the regulation of sialylation of NCAM.

Previous reports have well demonstrated changes in the ENS following various types of insults.^{14,16,40,41} Intestinal inflammation is also known to induce major changes in enteric innervation. These changes are anatomical, with loss of neurons²¹⁻²⁴ and gliosis.^{25,26} The alterations are also functional, as demonstrated by electrophysiological studies showing higher excitability of neurons in inflamed zones²⁷ and by modifications in the levels of certain neurotransmitters such as VIP²⁸ and substance P.²⁹ The present study shows for the first time that adhesion molecules such as PSA-NCAM are also implicated in the inflammatory response of the ENS. These findings suggest that PSA-NCAM reexpression by neurons that are phenotypically characterized as IPANs is part of the specific response that colonic inflammation triggers in the ENS.

After neuronal injury, changes and remodeling of neuronal networks may take place rapidly (over a period of hours) and may therefore predominantly involve synaptic plasticity. Axonal and collateral sprouting and formation of new synaptic connections with changes in the size of dendritic ramifications may also be involved, but over a longer time period.¹⁵ In the TNBS-induced colitis model, the upregulation of PSA-NCAM in a subset of IPANs may have several significances. One possibility is that the presence of PSA-NCAM may enhance the local intrinsic reflex by promoting the hyperexcitability of the IPANs that has been reported in guinea pig following TNBS-induced colitis.²⁷ This hyperexcitability involves intermediate conductance potassium channels²⁷ that

could be modulated by PSA-NCAM.³⁰ Another possibility is that PSA-NCAM may potentiate the effect of ligands that bind to receptors at the cell surface of IPANs. PSA chains could indeed influence lateral *cis* interactions, resulting in the regulation of multimerization and cluster formation of cell surface molecules.¹⁵ For example, the action of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin that has been recently shown as a functionally important actor in the ENS³¹, is sensitized by PSA-NCAM in the hippocampus.^{32,33} Considering the window during which reexpression occurs in the present model, it is less possible that the expression of PSA-NCAM is involved in rearrangements and repair in altered neuronal circuitry in the inflamed ENS.

The level of the PSA-NCAM reexpression is significantly larger in TNBS-treated than in control animals and can thus be considered specific. However, one could argue that it is low when compared to the expression seen in the ENS during development.⁴² The role of these neurons can still be important during the response of the ENS to injury. For example, neurons such as inhibitory longitudinal muscle neurons or descending myenteric interneurons represent small proportions of the total number of neurons in the ENS but are still functionally important (respectively ~2%, 2-4% in guinea pig).^{34,35}

Unexpectedly, we did not find any significant variation in PSA-NCAM's regulating enzymes transcripts in the colon following TNBS-colitis. Previous reports have shown a correlation between PSA-NCAM expression and the transcription rate of PST and STX.^{15,42,43,44} Since PSA-NCAM undergoes a relatively modest reexpression following colonic inflammation, the enzymes regulating this increase would not need to be astonishingly up-regulated. Other mechanisms such as enzyme activity or mobilizations of intracellular stocks of PSA-NCAM could explain this reexpression at the cell surface.

Whether the upregulation of PSA-NCAM by IPANs is favorable or not to the entire organism still remains to be verified. Since IPANs are important actors in the regulation of enteric reflexes, modulation of PSA-NCAM activity could act as a pharmaceutical target leading to the early repair of these crucial actors in

enteric motility, secretion, absorption and blood flow.⁴⁵ Such a mechanism could help maintain the integrity of the enteric microcircuits and allow for gut function modulation during and following pathologic inflammation.

Acknowledgments

The authors would like to thank Joseph Meyer Bouskila and Dr. Sylvain Chemtob for their contribution to this work. This project was supported by grants from the 'Fonds pour la recherche sur les maladies infantiles', the 'Fondation de l'Hôpital Ste-Justine', the Sick Kids foundation of Canada and the University of Montreal. Competing interests: the authors have no competing interests.

References

1. Ronn LC, Hartz BP, Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol* 1998;**33**:853-64.
2. Crossin KL, Krushel LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000;**218**:260-79.
3. Rougon G, Hobert O. New Insights into the Diversity and Function of Neuronal Immunoglobulin Superfamily Molecules. *Annu Rev Neurosci* 2003.
4. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003;**113**:867-79.
5. Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 1996;**19**:422-7.
6. Nakayama J, Fukuda M. A human polysialyltransferase directs in vitro synthesis of polysialic acid. *J Biol Chem* 1996;**271**:1829-32.
7. Angata K, Nakayama J, Fredette B, Chong K, Ranscht B, Fukuda M. Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J Biol Chem* 1997;**272**:7182-90.
8. Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* 2005;**280**:137-45.
9. Seki T, Rutishauser U. Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci* 1998;**18**:3757-66.

10. Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A. 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**:5234-44.
11. Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 2000;**20**:1446-57.
12. Sato K, Hayashi T, Sasaki C, Iwai M, Li F, Manabe Y, Seki T, Abe K. Temporal and spatial differences of PSA-NCAM expression between young-adult and aged rats in normal and ischemic brains. *Brain Research* 2001;**922**:135-139.
13. Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K. Changes of localization of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in rat hippocampus with exposure to repeated kindled seizures. *Brain Res* 2002;**946**:323-7.
14. Kim BG, Dai HN, McAtee M, Vicini S, Bregman BS. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2006;**198**:401-15.
15. Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;**36**:175-84.
16. Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 1999;**117**:1438-58.
17. Galligan JJ, Furness JB, Costa M. Migration of the myoelectric complex after interruption of the myenteric plexus: intestinal transection and regeneration of enteric nerves in the guinea pig. *Gastroenterology* 1989;**97**:1135-46.
18. Chaudhury A, Shariff A, Srinivas M, Sabherwal U. Changes in nitrenergic innervation of defunctionalized rat colon after diversion colostomy. *Neurogastroenterol Motil* 2004;**16**:475-87.

19. Ekblad E, Sjuve R, Arner A, Sundler F. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* 1998;**42**:836-44.
20. Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2005;**17**:4-15.
21. Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Autonomic Neuroscience* 2005;**117**:41-53.
22. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 1999;**155**:1051-7.
23. Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterology and Motility* 2005;**17**:751-760.
24. Lin A, Lourenssen S, Stanzel RDP, Blennerhassett MG. Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Experimental Neurology* 2005;**191**:337-343.
25. Bradley JS, Jr., Parr EJ, Sharkey KA. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res* 1997;**289**:455-61.
26. Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 2003;**41**:81-93.
27. Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2003;**547**:589-601.
28. Miampamba M, Sharkey KA. Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 1998;**10**:315-29.

29. Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flamig G, Eysselein VE, Adler G. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 2000;**119**:368-76.
30. Vaithianathan T, Matthias K, Bahr B, Schachner M, Suppiramaniam V, Dityatev A, Steinhauser C. Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents. *J Biol Chem* 2004;**279**:47975-84.
31. Grider JR, Piland BE, Gulick MA, Qiao LY. Brain-derived neurotrophic factor augments peristalsis by augmenting 5-HT and calcitonin gene-related peptide release. *Gastroenterology* 2006;**130**:771-80.
32. Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, Kiss JZ. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:4315-20.
33. Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccaud JP, Durbec P, Rougon G, Muller D, Kiss JZ. PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2001;**13**:1391-402.
34. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000;**81**:87-96.
35. Furness JB. The Enteric Nervous System. Blackwell Publishing, 2006.
36. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; **96**: 795-803.
37. McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 1999; **45**: 864-873.
38. Bradley P, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an

- enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology* 1982; **78**: 206-209.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
 40. Chaudhury A, Shariff A, Srinivas M, Sabherwal U. Changes in nitreergic innervation of defunctionalized rat colon after diversion colostomy. *Neurogastroenterology and motility* 2004; **16**: 475-487.
 41. Dwinell KL, Bass P, Zou F, Oaks JA. Small intestinal transections decrease the occurrence of tapeworm-induced myoelectric patterns in the rat. *Neurogastroenterology and motility* 2002; **14**: 349-356.
 42. Faure C, Chalazonitis A, Rheaume C, *et al.* Gangliogenesis in the enteric nervous system: Roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Dev Dyn* 2007; **236**: 44-59.
 43. Stoykova LI, Beesley JS, Grinspan JB, Glick MC. ST8Sia IV mRNA corresponds with the biosynthesis of alpha2,8sialyl polymers but not oligomers in rat oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 2001; **66**: 497-505.
 44. Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Vincent JD, Nothias F. Morphofunctional plasticity in the adult hypothalamus induces regulation of polysialic acid-neural cell adhesion molecule through changing activity and expression levels of polysialyltransferases. *J Neurosci* 2000; **20**: 2551-2557.
 45. Clerc N, Furness JB. Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterology & Motility* 2004; **16**: 24-27.
 46. Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *The Journal of cell biology* 1986; **103**: 2429-2437.

47. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989; **246**: 670-673.
48. Ren JJQ, Aika YY, Heizmann CCW, Kosaka TT. Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Experimental brain research* 1992; **92**: 1-14.
49. Celio MR, Baier W, Schärer L, Gregersen HJ, de Viragh PA, Norman AW. Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell calcium* 1990; **11**: 599-602.
50. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed R, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; **351**: 714-718.
51. Shiromani PJ, Armstrong DM, Bruce G, Hersh LB, Groves PM, Gillin JC. Relation of pontine choline acetyltransferase immunoreactive neurons with cells which increase discharge during REM sleep. *Brain Research Bulletin* 1987; **18**: 447-455.

Tables

Table I Primary and secondary antibodies

Antibody	Antigen	Dilution	Reference
Primary antibodies			
Mouse monoclonal	PSA	1:300	MAB5324, Chemicon, Temecula, CA, USA ⁴⁶
Rabbit polyclonal	Brain PGP 9.5	1:400	7863-0504, AbD Serotec, Hornby, ON, Canada ⁴⁷
Rabbit polyclonal	s100b	1:50	A-5110, DakoCytomation, Mississauga, ON, Canada ⁴⁸
Rabbit polyclonal	D-28K calbindin	1:100	CB38, Swant, Bellinzona, Switzerland ⁴⁹
Rabbit polyclonal	Human nNOS	1:100	610310, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada ⁵⁰
Goat polyclonal	Human placental ChAT	1:50	AB144P, Chemicon, Temecula, CA, USA ⁵¹
Secondary antibodies			
Goat	Rabbit antibodies	1:400	11008, Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Goat biotinylated	Mouse antibodies	1:200	BA-9200, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Donkey	Goat antibodies	1:400	11055, Invitrogen, Burlington, ON, Canada
Donkey biotinylated	Mouse F(ab') ₂ fragment	1:200	715-066-020, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

ChAT: choline acetyltransferase, nNOS: neuronal nitric oxide (NO) synthase, PGP 9.5: protein gene product 9.5, PSA: polysialic acid, PSA-NCAM: Polysialylated neuronal cell adhesion molecule.

Figure legends

Figure 1 Severe macroscopic and histological inflammation is induced in TNBS-treated rats. TNBS treated animals showed significantly higher inflammation at 3 days compared to 7 days, 21 days and controls (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). The animals treated 21 days before sacrifice displayed no significant inflammation compared to saline controls. Mann-Whitney t tests were performed to compare groups ($n = 3-6$).

Figure 2 Representative micrographs of rat myenteric neurons and enteric glial cells combined with a marker for PSA-NCAM. PSA-NCAM reexpression following colitis is colocalized with neuronal marker PGP 9.5 but not with glial marker s100b. Arrows point to same cells on each horizontal series of photos. Scale = 50 μm .

Figure 3 PSA-NCAM reexpression in TNBS, ethanol and saline treated rats at T3, T7 and T21. PSA-NCAM is significantly reexpressed in TNBS-induced colitis at T3 compared to ethanol and saline controls. PSA-NCAM expression also decreases significantly in TNBS treated animals at T7 and T21 compared to T3 (** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. T3 TNBS). Differences were assessed by Khi square tests ($n = 3-6$).

Figure 4 Representative micrographs of rat myenteric neurons marked with antibodies against subtypes of enteric neurons and PSA-NCAM. Neurons reexpressing PSA-NCAM display immunoreactivity for calbindin and cholineacetyltransferase (ChAT). PSA-NCAM immunoreactive neurons were not immunoreactive for neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Scale = 100 μm .

Figure 5 QRT-PCR quantification of polysialyltransferases PST and STX mRNA in rat colon following TNBS-induced colitis. No significant variation in PST and STX mRNA relative expression was observed following colitis. Mann-Whitney t-tests were used to assess difference of expression between groups. ($n = 3-6$).

Figures

Figure 1

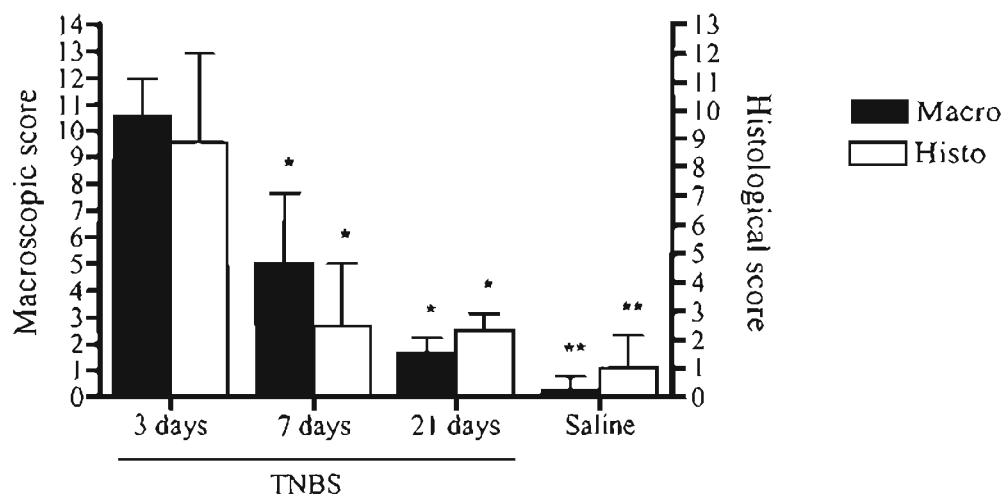


Figure 2

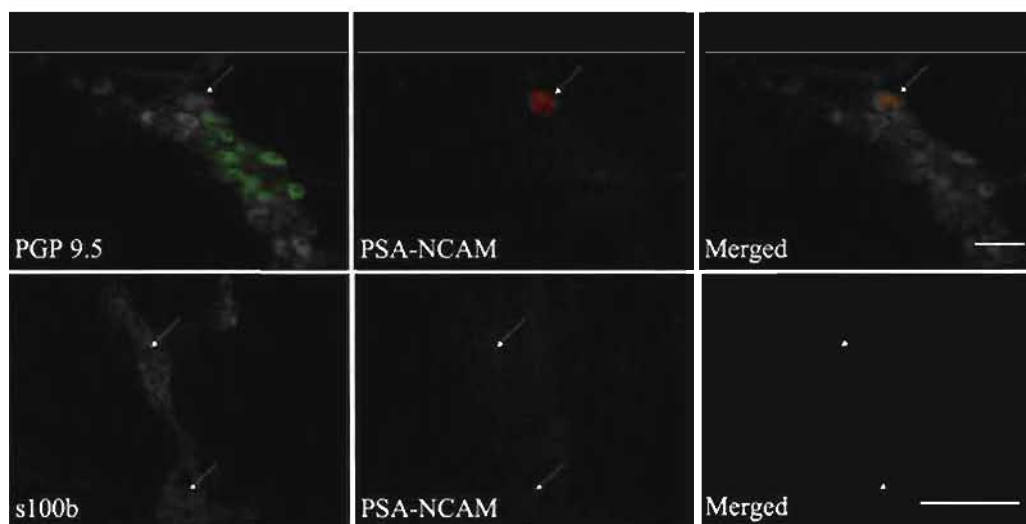


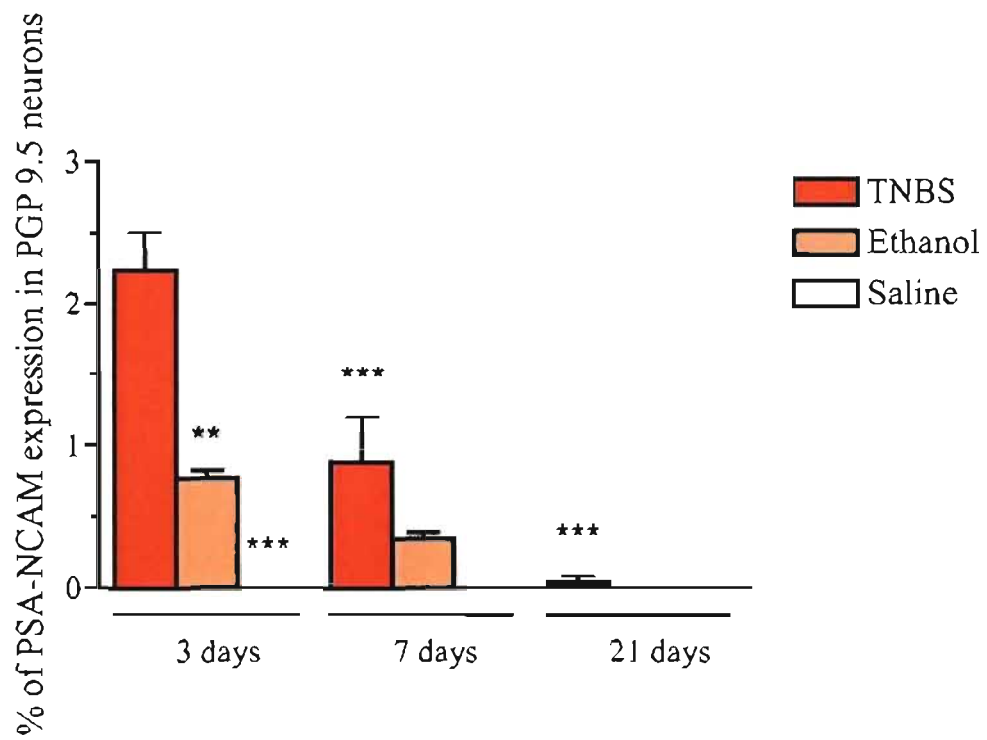
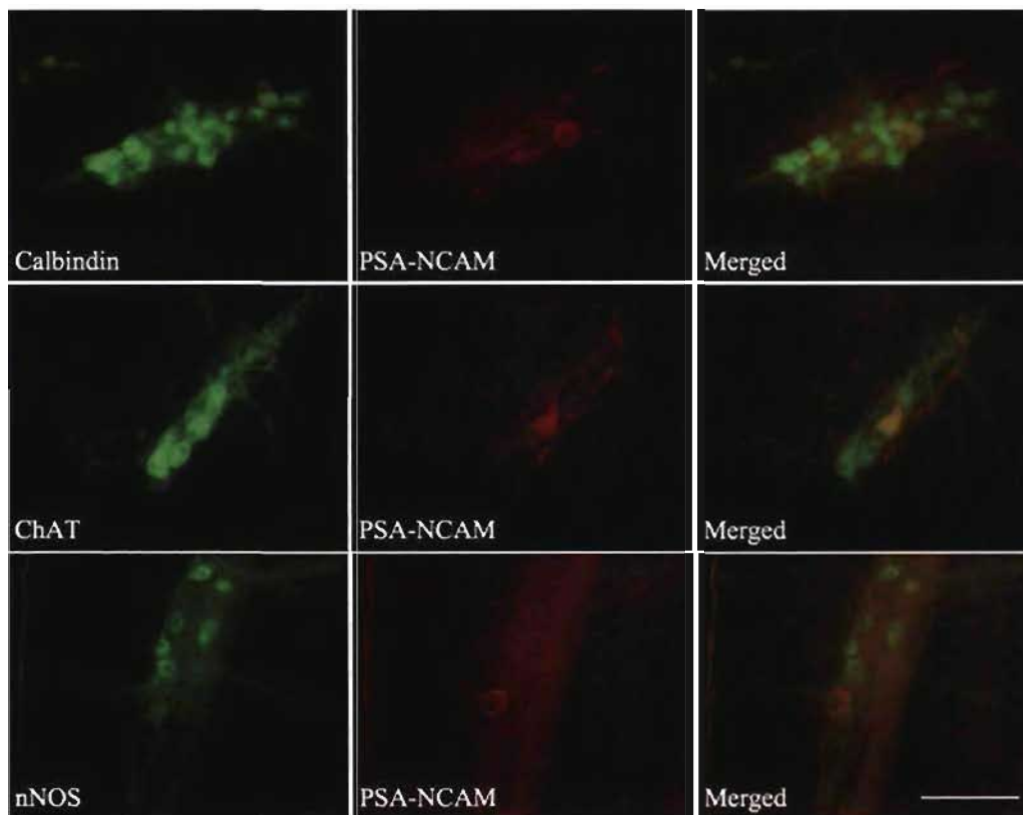
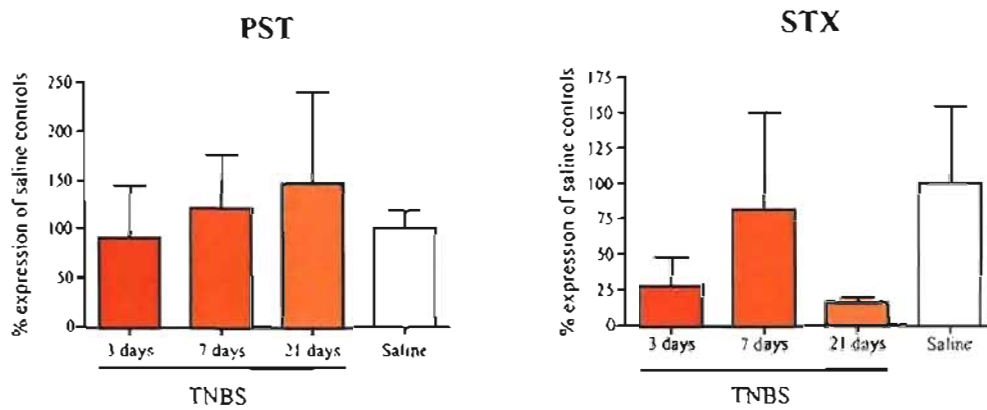
Figure 3

Figure 4**Figure 5**

Discussion

Le but de cette étude était de mesurer et décrire la réexpression de PSA-NCAM et l'expression des transcrits de ses enzymes régulatrices dans le plexus myentérique du rat adulte suite à une inflammation colique.

Réexpression de PSA-NCAM

Nous démontrons qu'une réexpression de PSA-NCAM est observée suite à la colite induite par le TNBS. Cette réexpression est présente exclusivement dans les neurones myentériques. Cette réponse suggère le déclenchement d'un mécanisme de plasticité qui influence la fonction de l'intestin pendant ou après la colite. Plusieurs études ont démontré la plasticité du SNE suite à toutes sortes de perturbations.^{5,69,70,72} De plus, l'inflammation induit des changements importants dans les phénotypes et l'activité électrique des neurones.¹¹ Dans le SNC, PSA-NCAM est réexprimée suite à des lésions.²⁻⁴ La présente étude démontre pour la première fois qu'une réexpression de PSA-NCAM fait partie de la réponse à l'inflammation dans le SNE. Ce mécanisme pourrait contribuer à la plasticité du SNE dans des conditions inflammatoires en favorisant des réarrangements dans les microcircuits entériques. PSA-NCAM pourrait jouer un rôle dans la réparation cellulaire suite aux dommages causés par l'inflammation. Elle pourrait d'autre part faire partie des mécanismes déployés par le SNE pour moduler l'intégrité des réflexes intrinsèques suivant les dommages.

La réexpression de PSA-NCAM observée suite à une colite induite par le TNBS est spécifique à cet agent, celle-ci étant significativement plus élevée à 3 jours qu'à 7 et 21 jours. De plus, on remarque une réexpression plus marquée de PSA-NCAM chez les animaux ayant développé une colite plus sévère. Même si le modèle de colite induite par le TNBS est reconnu comme démontrant une réponse inégale des animaux traités⁷, l'amplitude de la réexpression semble directement reliée à l'intensité du processus inflammatoire.

L'amplitude de la réexpression de PSA-NCAM est significativement plus élevée que dans un animal normal. On peut donc la considérer comme spécifique. Elle est par contre basse si on la compare à l'expression de PSA-NCAM dans le SNE en développement.⁴⁹ Pendant cette période où les circuits neuronaux s'établissent, PSA-NCAM est requise pour une régulation fine des mécanismes de formation du SNE. L'expression maximale, au moment de la naissance, est d'environ 80% dans le plexus myentérique et de 55% dans le plexus sous-muqueux. La population de neurones *IPANs* composant 26% de la population totale de neurones du plexus myentérique (Faure, données non publiées), la présente réexpression (2.2%) constitue 8.5% de la population de neurones *IPANs* dans le plexus myentérique. Certains types neuronaux comme les motoneurones myentériques inhibiteurs et les interneurones myentériques descendants sont présents en proportions relativement basses dans le SNE (~2% et 2-4% respectivement chez le cobaye^{1,13}) (Tableau I) et jouent un rôle physiologique important dans la fonction du tube digestif.

Spécificité de la réexpression dans les IPANs

La réexpression de PSA-NCAM observée survient dans les neurones *IPANs* du plexus myentérique. Les neurones réexprimant PSA-NCAM démontrent de l'immunoréactivité pour calbindine et ChAT. Dans le plexus myentérique, seules les *IPANs* contiennent de la calbindine en combinaison avec ChAT (Tableau I). Les *IPANs* sont les premiers neurones des réflexes intrinsèques du SNE et transmettent les stimuli lumineux aux neurones effecteurs. Ces réflexes, dans le plexus myentérique, contrôlent la motilité et la circulation sanguine de l'intestin.^{1,22} Les *IPANs* sont particulièrement affectés par l'inflammation colique.^{12,25,93,95,97,98} Il est logique de croire que l'inflammation générée dans le modèle TNBS, agissant majoritairement dans la *lamina propria*, affecte plus grandement les projections des *IPANs*, qui innervent cette région.⁹⁸

PSA-NCAM cause l'agrégation du récepteur tyrosine kinase trkB lorsqu'elle se lie à une autre molécule de PSA-NCAM.² L'activation résultante de trkB augmente la possibilité pour le facteur neurotrophique BDNF, ligand de trkB,

de venir lier son récepteur et ainsi promouvoir la croissance et le remodelage des neurones. La réexpression de PSA-NCAM dans les *IPANs* pourrait donc permettre un réarrangement physique de ces neurones par l'attraction de ligands promoteurs de la croissance, modulant ainsi les fonctions de l'intestin.

Expression des transcrits des enzymes régulatrices de PSA-NCAM

Dans cette étude, l'expression de l'ARNm des enzymes responsables de la polysialylation de NCAM a été mesurée par PCR quantitatif en temps réel. Nous avons exprimé la quantité d'ARNm de chaque enzyme dans les animaux traités au TNBS relativement aux animaux contrôles.⁹⁹ Aucune variation significative de l'expression des transcrits des enzymes régulatrices de PSA-NCAM (PST et STX) n'a été observée malgré une augmentation visible de l'expression des transcrits de PST à 7 et 21 jours et une diminution de l'expression des transcrits de STX à 3 et 21 jours suivant l'induction de la colite.

La méthode de la RT-PCR quantitative comporte 3 étapes : La conversion d'ARNm en ADNc, l'amplification d'une région cible par la réaction de polymérisation en chaîne et la quantification en temps réel des produits d'amplification. Malgré son utilité évidente, plusieurs variables dans les étapes de réalisation font de la QRT-PCR une méthode controversée. L'optimisation de la qualité et la quantité de l'ADNc de départ et des paramètres d'amplification est nécessaire à la bonne reproductibilité des résultats obtenus. La quantité et la qualité de l'ADNc sont en partie dépendantes de la réaction de transcription inverse. De plus, les méthodes d'analyse des résultats de l'amplification permettant de quantifier le produit sont diversifiées et peu concordantes. Les résultats et leur interprétation sont parfois différents d'une méthode d'analyse à l'autre. Même en contrôlant tous les facteurs d'optimisation, une variabilité importante est possible entre les expérimentateurs.¹⁰⁰ Un autre point de controverse est le choix du gène normalisateur. Pour pouvoir comparer l'expression d'une séquence dans un état pathologique, il est nécessaire de normaliser son expression par rapport à celle

d'un gène ubiquitaire dont l'expression ne varie pas peu importe la condition. Utilisé largement, la *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) est maintenant reconnue comme ayant une expression très variable de son ARNm.^{100,101} D'autres normalisateurs, comme l'ARNr et le gène de la β -actine, sont utilisés avec quelques réserves. Plusieurs méthodes d'analyse sont reconnues et utilisées pour transformer et comparer les résultats d'une réaction d'amplification par PCR quantitatives. Les différences entre les méthodes reposent majoritairement sur le traitement qu'elle font de l'efficacité de la réaction d'amplification.¹⁰² Nous n'avons observé aucune variation significative de l'expression de l'ARNm des enzymes régulatrices de PSA-NCAM.

Le degré de polysialylation de NCAM est proportionnel à l'expression de PST et STX.^{2,49,103} Il est donc logique de penser que l'utilisation du tissu intestinal total et la réexpression relativement faible de PSA-NCAM peuvent expliquer l'absence de variation significative. En effet, si une enzyme peut provoquer la polysialylation de plusieurs molécules de NCAM, une réexpression de PSA-NCAM comme celle observée peut fort probablement s'effectuer sans variation remarquable de l'expression des enzymes. D'autres mécanismes peuvent expliquer la réexpression de PSA-NCAM, comme un transport plus important de PSA-NCAM à la membrane ou une activité enzymatique plus élevée des enzymes régulatrices. L'hybridation *in situ* pourrait potentiellement vérifier les variations dans l'expression des enzymes régulatrices de PSA-NCAM dans le SNE.

Conclusion

Les neurones de l'intestin forment des réseaux contrôlant l'activité digestive. Suite à des événements pathologiques perturbant le SNE, les neurones démontrent, comme dans le SNC, une grande capacité plastique leur permet ainsi qu'à l'organisme entier de s'adapter. La plasticité démontrée par les *IPANs* suite à la colite est fonction de la sévérité de l'inflammation. Il demeure à vérifier si cette réaction est favorable ou non pour l'organisme. Il est par

contre séduisant d'envisager la réexpression de ce mécanisme connu au cours du développement pour maintenir ou rétablir la fonction du système adulte pendant et suite à une condition pathologique comme les maladies inflammatoires intestinales. Puisque les *IPANs* sont des acteurs primordiaux dans la régulation des réflexes entériques, la modulation de l'expression de PSA-NCAM se présente comme une cible thérapeutique de choix.^{25,26} On peut imaginer des thérapies basées sur un contrôle de ce type de neurones, permettant des avancées dans la recherche pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales.

Bibliographie

1. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 2000; **81**: 87-96.
2. Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; **36**: 175-184.
3. El Maarouf A, Petridis AK, Rutishauser U. Use of polysialic acid in repair of the central nervous system. *PNAS* 2006; **103**: 16989-16994.
4. Kim BG, Dai HN, McAtee M, Vicini S, Bregman BS. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Exp Neurol* 2006; **198**: 401-415.
5. Giaroni C, De Ponti F, Cosentino M, Lecchini S, Frigo G. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1438-1458.
6. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice* 2006; **3**: 390-407.
7. Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002; **37**: 409-417.
8. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; **96**: 795-803.
9. Linden DR, Chen J-X, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2003; **285**: 16.
10. Linden DR, Foley KF, McQuoid C, Simpson J, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil* 2005; **17**: 565-574.
11. Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2005; **17**: 4-15.
12. Neunlist M, Aubert P, Toquet C, *et al.* Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; **52**: 84-90.
13. Furness JB. *The Enteric Nervous System*. Victoria: Blackwell Publishing, 2006.

14. Furness JB. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Autonomic Neuroscience* 2006; **130**: 1-5.
15. Boeckxstaens GE. Understanding and controlling the enteric nervous system. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; **16**: 1013-1023.
16. Nurgali K, Furness JB, Stebbing MJ. Correlation of electrophysiology, shape and synaptic properties of myenteric AH neurons of the guinea pig distal colon. *Autonomic Neuroscience* 2003; **103**: 50-64.
17. Browning KN, Lees GM. Myenteric neurons of the rat descending colon: electrophysiological and correlated morphological properties. *Neuroscience* 1996; **73**: 1029-1047.
18. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology* 2004; **72**: 143-164.
19. Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA. Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. *J Physiol* 2005; **564**: 863-875.
20. Rugiero F, Gola M, Kunze WAA, Reynaud J-C, Furness JB, Clerc N. Analysis of whole-cell currents by patch clamp of guinea-pig myenteric neurones in intact ganglia. *J Physiol* 2002; **538**: 447-463.
21. Costa M, Brookes SJH, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1996; **75**: 949-967.
22. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; **45 Suppl 2**: II6-II16.
23. Furness JB. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Autonomic Neuroscience* 2006; **125**: 81-85.
24. Furness JB, Sanger GJ. Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 612-622.
25. Clerc N, Furness JB. Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. *Neurogastroenterology & Motility* 2004; **16**: 24-27.
26. Clerc N, Gola M, Vogalis F, Furness JB. Controlling the excitability of IPANs: a possible route to therapeutics. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 657-664.

27. Denes V, Gabriel R. Calbindin-immunopositive cells are cholinergic interneurons in the myenteric plexus of rabbit ileum. *Cell Tissue Res* 2004; **318**: 465-472.
28. Mawe GM, Coates MD, Moses PL. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006; **23**: 1067-1076.
29. Kunze WAA, Clerc N, Bertrand PP, Furness JB. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *The Journal of Physiology* 1999; **517**: 547-561.
30. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007; **132**: 397-414.
31. Furness JB, Sanger GJ. Gastrointestinal neuropharmacology: identification of therapeutic targets. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 609-611.
32. Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJH, Costa M. Cholinergic and nitrenergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut* 2002; **51**: 70-75.
33. Furness JB. Intestinofugal neurons and sympathetic reflexes that bypass the central nervous system. *Journal of comparative neurology* 2003; **455**: 281-284.
34. Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2004; **20 Suppl 7**: 3-14.
35. Lecci A, Santicioli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 630-641.
36. Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 2002; **5**: 329-349.
37. Vanderwinden JJM. Role of Interstitial Cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *European journal of morphology* 1999; **37**: 250-256.
38. Matini P, Faussone-Pellegrini MS. Ultrastructural localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in the rat ileum. *Neurosci Lett* 1997; **229**: 45-48.
39. Sanders KM, Ward SM. Kit mutants and gastrointestinal physiology. *The Journal of physiology* 2007; **578**: 33-42.
40. Sanders KM. Interstitial cells of Cajal at the clinical and scientific interface. *The Journal of physiology* 2006; **576**: 683-687.

41. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, *et al.* Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998; **93**: 189-201.
42. Andrews PLR, Sanger GJ. Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 650-656.
43. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. 4e edn. New York: McGraw-Hill, 2000.
44. Allan DW, Greer JJ. Polysialylated NCAM expression during motor axon outgrowth and myogenesis in the fetal rat. *J Comp Neurol* 1998; **391**: 275-292.
45. Dityatev A, Dityateva G, Sytnyk V, *et al.* Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J Neurosci* 2004; **24**: 9372-9382.
46. Fujimoto I, Bruses JL, Rutishauser U. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem* 2001; **276**: 31745-31751.
47. Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience* 2007; **10**: 19-26.
48. Crossin KL, Krushel LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000; **218**: 260-279.
49. Faure C, Chalazonitis A, Rheaume C, *et al.* Gangliogenesis in the enteric nervous system: Roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Dev Dyn* 2007; **236**: 44-59.
50. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; **113**: 867-879.
51. Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V, Bock E. Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochem Res* 2003; **28**: 127-141.
52. Angata K, Fukuda M. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 2003; **85**: 195-206.

53. Angata K, Nakayama J, Fredette B, Chong K, Ranscht B, Fukuda M. Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**: 7182-7190.
54. Bouzioukh F, Tell F, Jean A, Rougon G. NMDA receptor and nitric oxide synthase activation regulate polysialylated neural cell adhesion molecule expression in adult brainstem synapses. *J Neurosci* 2001; **21**: 4721-4730.
55. Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell D, McEwen B. PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Res* 2002; **927**: 111-121.
56. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; **274**: 1123-1133.
57. Young HM, Anderson RB, Anderson CR. Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Autonomic neuroscience* 2004; **112**: 1-14.
58. Bruses JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 2001; **83**: 635-643.
59. Burns AJ, Thapar N. Advances in ontogeny of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility* 2006; **18**: 876-887.
60. Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 2002; **5**: 224-247.
61. Natarajan D, Pachnis V. Development of the Enteric Nervous System. In: Sanderson IR, Walker AW, eds. *Development of the Gastrointestinal Tract*, 1st edn. London: B.C. Decker, Inc., 1999: 324.
62. von Boyen GBT, Reinshagen M, Steinkamp M, Adler G, Kirsch J. Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors. *Journal of Gastroenterology* 2002; **37**: 583-588.
63. Brocco MA, Frasch AC. Interfering polysialyltransferase ST8SiaII/STX mRNA inhibits neurite growth during early hippocampal development. *FEBS Lett* 2006; **580**: 4723-4726.

64. 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. *The journal of neuroscience* 2000; **20**: 5234-5244.
65. Bonfanti L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in Neurobiology* 2006; **80**: 129-164.
66. Cowen T, Gavazzi I. Plasticity in adult and ageing sympathetic neurons. *Prog Neurobiol* 1998; **54**: 249-288.
67. 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.
68. Galligan JJ. Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Current opinion in pharmacology* 2002; **2**: 623-629.
69. Chaudhury A, Shariff A, Srinivas M, Sabherwal U. Changes in nitrenergic innervation of defunctionalized rat colon after diversion colostomy. *Neurogastroenterology and motility* 2004; **16**: 475-487.
70. Ekblad E, Sjuve R, Arner A, Sundler F. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* 1998; **42**: 836-844.
71. Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *The Journal of physiology* 2001; **536**: 555-568.
72. Dwinell KL, Bass P, Zou F, Oaks JA. Small intestinal transections decrease the occurrence of tapeworm-induced myoelectric patterns in the rat. *Neurogastroenterology and motility* 2002; **14**: 349-356.
73. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translational Research* 2007; **149**: 173-186.
74. Griffiths AM, Hugot J-P, Leichtner AM, Higuchi L. Inflammatory Bowel Disease. In: *Pediatric Gastroenterology*.
75. Lesage S, Zouali H, Cézard J-P, *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics* 2002; **70**: 845-857.

76. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6e edn. New York: Garland Science, 2005.
77. Fujino S, Andoh A, Bamba S, *et al*. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; **52**: 65-70.
78. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; **21**: 467-476.
79. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003; **9**: 218-222.
80. Strober W, Nakamura K, Kitani A. The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001; **107**: 667-670.
81. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994; **107**: 1726-1735.
82. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *The Journal of experimental medicine* 1998; **188**: 1929-1939.
83. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; **98**: 694-702.
84. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International Immunology* 1993; **5**: 1461-1471.
85. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; **75**: 253-261.
86. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; **75**: 263-274.
87. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; **10**: 387-398.

88. Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, *et al.* The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *Journal of clinical immunology* 1997; **17**: 282-292.
89. Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 2004; **127**: 635-657.
90. MacQueen G, Marshall J, Perdue M, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 1989; **243**: 83-85.
91. Lin A, Lourenssen S, Stanzel RDP, Blennerhassett MG. Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Experimental Neurology* 2005; **191**: 337-343.
92. Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, *et al.* Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2005; **17**: 751-760.
93. Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the Enteric Nervous System in Experimental Colitis. *Am J Pathol* 1999; **155**: 1051-1057.
94. Lin Z, Sandgren K, Ekblad E. Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine. *Autonomic neuroscience* 2003; **107**: 9-19.
95. Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16 Suppl 1**: 133-136.
96. Coates MD, Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2006; **18**: 464-471.
97. Linden DR, Sharkey KA, Ho W, Mawe GM. Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* 2004; **557**: 191-205.
98. Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2003; **547**: 589-601.

99. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* 2006; **1**: 1559-1582.
100. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology* 2002; **29**: 23-39.
101. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; **313**: 856-862.
102. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005; **39**: 75-85.
103. Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Vincent JD, Nothias F. Morphofunctional plasticity in the adult hypothalamus induces regulation of polysialic acid-neural cell adhesion molecule through changing activity and expression levels of polysialyltransferases. *J Neurosci* 2000; **20**: 2551-2557.
104. Weinhold B, Seidenfaden R, Rockle I, *et al.* Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42971-42977.