



# Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale appliqué à un modèle de colite expérimentale

Julien Meregnani

## ► To cite this version:

Julien Meregnani. Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale appliqué à un modèle de colite expérimentale. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00420313

**HAL Id: tel-00420313**

**<https://theses.hal.science/tel-00420313>**

Submitted on 28 Sep 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

**Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Biologie cellulaire et intégrative  
Spécialité Neurosciences Neurobiologie

Thèse

**Effet anti-inflammatoire de  
l'électrostimulation vagale appliqué à  
un modèle de colite expérimentale**

**Par**

M. Julien MEREGNANI

**Pour obtenir le titre de**

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Soutenue le .....2009

Thèse dirigée par

le Pr. Bruno Bonaz et le Dr. Didier Clarençon

**Membres du jury :**

Pr. Feuerstein Claude

Pr. Thiolet Catherine (Rapporteur)

Pr. Théodorou Vassilia (Rapporteur)

Pr. Benabid Alim Louis

Pr. Bonaz Bruno (directeur de thèse)

Dr. Clarençon Didier (co-directeur de thèse)

Thèse préparée au sein du laboratoire Stress et interactions  
Neurodigestives  
(EA3744 ; INSERM U836)

A ma famille, A ma fille  
A tous ceux qui me sont chers sans qui je n'aurais pu parvenir jusque là.

Vis comme si tu devais mourir demain. Apprends comme si tu devais  
vivre toujours. (Mahatma Gandhi)

Je souhaite remercier tout particulièrement,

Le **Professeur Bruno Bonaz**, Directeur de Recherche du laboratoire SIND (EA3744) et Gastroentérologue au CHU de Grenoble, pour avoir dirigé cette thèse ainsi que pour avoir su, depuis l'hôpital, initier et s'impliquer dans ce travail.

Le **Médecin en chef Didier Clarençon**, responsable de l'unité de « Neurophysiologie Expérimentale » du département de radiobiologie et radiopathologie du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA), pour avoir co-dirigé cette thèse et pour son implication au quotidien dans ce projet de recherche.

**Mylène Vivier**, technicienne au CRSSA, pour son aide dans la conduite de ce projet, notamment dans les implantations chirurgicales ainsi qu'au moment des prélèvements tissulaires.

Le **Docteur Valérie Sinniger**, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils, ainsi que l'aide qu'elle m'a souvent apportée notamment en ce qui concerne le modèle de colite expérimentale.

Le **Médecin en chef Frédéric Canini**, responsable de l'unité de « Neurophysiologie du stress » du département des Facteurs humains (CRSSA), et les membres de son équipe, pour l'aide qu'ils ont su m'apporter en ce qui concerne la télémétrie et l'analyse de ces données.

Le **Docteur Muriel Jacquier-Sarlin**, pour m'avoir initié à la technique du western blot, ainsi que pour l'aide qu'elle a su m'apporter par la suite concernant la signalisation intracellulaire.

Le **Médecin en chef André Peinnequin**, responsable du « Pôle de génomique » (CRSSA) ainsi que **Catherine Mouret** pour avoir apporté leur savoir-faire en ce qui concerne la RT-PCR et son analyse.

Le **Pharmacien en chef Antonia Alonso**, et son équipe **Josiane Denis** et **Valérie Leroux**, du « Laboratoire d'analyses biologiques » pour leur savoir-faire et l'aide qu'elles m'ont apportée concernant le dosage des protéines.

Le **Docteur Sonia Pellissier**, pour l'aide qu'elle m'a apportée en ce qui concerne la motricité digestive et l'implantation chirurgicale indispensable pour son étude.

Le **Docteur Edgar Gentilhomme** et **Aurélié Faure** pour leur aide concernant la préparation des tissus pour l'analyse anatomo-pathologique.

Le **Docteur Marie-Hélène Laverrière**, pour son aide et ses conseils concernant l'anatomo-pathologie des tissus digestifs.

Le **Docteur Agnès Job**, du département des « Facteurs Humains » du CRSSA, pour son aide concernant l'analyse statistique multifactorielle.

**Chloé Picq**, Doctorante qui a pris la suite du projet de stimulation vagale, pour les résultats que tu as su obtenir et qui ont complété les miens. Je te souhaite d'éprouver autant de plaisir que j'ai pu en avoir en travaillant sur ce sujet.

**Benjamin Ducarouge**, Doctorant sur le versant « perméabilité digestive », pour l'aide que tu as pu m'apporter et les réflexions que nous avons partagées.

Le **Docteur Jean Delbecke** et à son équipe du « Laboratoire de Génie de la Réhabilitation Neurale » de l'Université catholique de Louvain, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé durant mon séjour en Belgique et pour m'avoir transmis leurs connaissances concernant la fabrication des électrodes de stimulation vagale.

Les animaliers qui ont su prendre soin des animaux et permettre le déroulement des différentes études dans les meilleures conditions.

Toutes les personnes du GIN, du CRSSA et du CHU qui ont apporté une pierre à cet édifice ou ne serait-ce que leur bonne humeur...

Aux membres du jury, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail,

Au **Professeur Alim Louis Benabid**, qui me fait l'immense honneur d'apporter son regard critique issu de sa grande expérience dans la stimulation neuronale. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements.

Au **Professeur Claude Feuerstein**, directeur de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN ; U836). Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements pour votre regard critique sur ce travail, ainsi que pour ce que vous apportez aux Neurosciences Grenobloises.

Au **Médecin en chef et Professeur agrégé du Val-de-Grâce Catherine Thiolet**, qui me fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur et qui a déjà apporté son regard critique dans ce projet. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements.

Au **Docteur Vassilia Theodorou**, qui me fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements pour le regard critique que vous y apportez.

# Résumé

## Introduction

Le nerf vague est un nerf mixte composé de 20% de fibres efférentes et 80% de fibres afférentes. La stimulation électrique du nerf vague (VNS) est actuellement employée comme thérapie de certaines formes d'épilepsies et de dépressions chez l'Homme. Le nerf vague a également un double rôle anti-inflammatoire : i) d'une part via la voie classique faisant intervenir les fibres vagales afférentes centripètes qui peuvent activer l'axe corticotrope, ii) d'autre part via la voie cholinergique anti-inflammatoire, plus récemment décrite. L'effet anti-inflammatoire est dans ce cas lié à l'activation des efférences vagales centrifuges. En effet, les terminaisons de ces fibres libèrent, en périphérie, de l'acétylcholine qui, en se liant au récepteur  $\alpha 7$ -nicotinique exprimé en particulier par les macrophages, inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  notamment). Bien que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) aient une incidence en augmentation, leur origine exacte reste méconnue et semble liée à de nombreux facteurs. Les patients atteints de MICI présentent des troubles au niveau de l'activation du système immunitaire qui vont engendrer l'apparition de lésions au niveau intestinal. Les traitements des MICI disponibles actuellement ne permettent pas une guérison totale, mais ont uniquement un rôle suspensif.

## But

Les travaux réalisés ont eu pour objectif d'utiliser la VNS afin de diminuer l'inflammation dans un modèle de colite expérimentale chez le rat. Des études complémentaires ont été réalisées pour étudier les mécanismes de cet effet anti-inflammatoire ainsi que les effets centraux et digestifs moteurs de la VNS.

## Matériels et Méthodes

La colite a été induite par l'instillation intra-colique d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). La VNS a été réalisée grâce à une électrode bipolaire implantée de manière chronique au niveau du nerf vague gauche (paramètres de stimulation : 1mA, 5Hz, 500 $\mu$ s, 10s ON, 90s OFF) ; l'animal a été stimulé pendant 3 heures le jour de l'injection du TNBS et pendant les 4 jours

suivants. Les paramètres physiologiques de température corporelle et d'activité locomotrice ont été suivis en continu par télémetrie pendant cette période. L'animal a été sacrifié 5 jours après l'instillation, le côlon a été prélevé et deux zones tissulaires ont été distinguées : la partie lésée et la partie adjacente. Ces prélèvements ont ensuite été utilisés pour une analyse histologique, une quantification de la myéloperoxydase et une quantification des ARNm des cytokines par la technique de RT-PCR. L'inflammation globale induite par la colite a été étudiée par l'intermédiaire d'un index multiparamétrique global comprenant des paramètres physiologiques intégrés (température corporelle, activité locomotrice), tissulaires (surface des lésions) et moléculaires (ARNm des marqueurs d'inflammation). L'approfondissement des connaissances mécanistiques de l'effet anti-inflammatoire obtenu a été réalisé par une étude par western blot et immunohistochimie de l'expression des protéines impliquées dans les voies intracellulaires d'activation des cellules immunitaires (protéines STAT). Enfin les effets latéraux de la VNS ont été étudiés au niveau central par la technique d'immunohistochimie du *c-fos* et par l'analyse des électromyogrammes du jéjunum au niveau périphérique.

Les résultats mettent en évidence chez les animaux stimulés : une amélioration clinique significative avec une perte pondérale réduite, une tendance à la réduction des lésions intestinales, de l'expression de la myéloperoxydase et du taux d'ARNm de cytokines dans le tissu colique, ainsi qu'une diminution significative de l'index global d'inflammation. Au niveau mécanistique, la VNS induit des changements dans la signalisation intracellulaire, au niveau de la lésion et juste au-dessus de celle-ci. Enfin la VNS semble induire aussi des changements modérés au niveau de l'activation neuronale centrale et de la motricité digestive.

### **Conclusion**

Ces données expérimentales montrent l'intérêt d'activer la voie cholinergique par la VNS pour obtenir un effet anti-inflammatoire ciblé au niveau du tube digestif. La VNS pourrait être envisagée dans le traitement des poussées ou le maintien en phase de rémission des patients atteints de MICI.

# Abstract

## Background

The vagus nerve is composed of 20% of efferents and 80% of afferents. Nowadays, vagus nerve stimulation (VNS) is used in the treatment of refractory epilepsy and depression in Human. Moreover, the vagus nerve has anti-inflammatory properties through its i) afferents by activating the hypothalamic pituitary adrenal axis, ii) its efferents by the cholinergic anti-inflammatory pathway has also been reported more recently. In fact, acetylcholine can binds  $\alpha 7$  nicotinic receptor of immune cells (like macrophages) to inhibit pro-inflammatory cytokines secretions (like  $\text{TNF}\alpha$ ). Inflammatory bowel diseases (IBD) are multifactorial pathologies that produce hyper-activations of the immune system and hence to intestinal lesion. Nowadays, IBD treatments not induce a total remission but have only suspensive effects.

## Aim

The aim of this study was to evaluate the effect of chronic VNS on an experimental colitis in rats and characterize its anti-inflammatory mechanisms and its lateral effects on brain and on intestinal motility.

## Methods

Colitis was induced in rats by intracolonic instillation of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). VNS was performed for 3 hours during five days in freely moving rats chronically implanted with an electrode on the left cervical vagus nerve with stimulation parameters known to activate vagal efferents (1mA, 5Hz, 500 $\mu$ s, 10s ON, 90s OFF). Body temperature and locomotor activity were recorded. At the end of stimulation, evaluation of colitis was assessed by physiological and local parameters both at the level of the damaged colon and immediately above. A global multiparametric index of colitis was generated. Western blot analysis and immunohistochemistry of STAT proteins were performed to best characterized mechanisms of action of VNS. A study of the lateral effects

of VNS was performed by *c-fos* immunohistochemistry in the brain and by the recording of migrant motor complex at the peripheral level.

### **Results**

VNS induced a significant improvement of physiological parameters such as body weight loss and a reduction of inflammatory markers notably in mild damaged tissues. This effect was associated with a reduction of the multivariate index of colitis. TNBS colitis induced significant increase of STAT levels in the lesion and above, these changes were improved by VNS. In addition, VNS induced slight effects on central neuronal activation, and on intestinal motility.

### **Conclusion**

All together, these data argue for a therapeutic effect of VNS on this model of colitis. This study opens a potential therapeutic avenue for the use of VNS in patients with IBD.

Ce travail a fait l'objet des communications suivantes :

### **Publications**

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, A. Peinnequin, C. Mouret, V. Sinniger, C. Picq, A. Job, F. Canini, M. Jacquier-Sarlin, B. Bonaz.  
*Vagus nerve stimulation improves TNBS-induced colitis in rat.*  
Gut, soumis, en attente de révision.

### **Communications orales**

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, C. Picq, S. Pellissier, V. Sinniger, B. Bonaz.  
*Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale appliqué à un modèle de colite expérimentale.*  
22<sup>ème</sup> Réunion du Club Français de Motricité Digestive (CFMD), Marseille, le 12 juin 2008.

D. Clarençon, J. Meregnani, M. Vivier, C. Picq, S. Pellissier, V. Sinniger, B. Bonaz.  
*Neurostimulation vagale : une nouvelle approche thérapeutique de la colite expérimentale chez le rat.*  
5<sup>ème</sup> Colloque du groupe francophone de réflexion sur la télémétrie, Paris le 25 janvier 2008.

### **Communications affichées**

J. Meregnani, D. Clarençon, A. Peinnequin, C. Picq, V. Sinniger, M. Vivier, C. Mouret, B. Bonaz.  
*Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation applied to a rat model of experimental colitis.*  
9<sup>ème</sup> Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, le 28 mai 2009.

D. Clarençon, J. Meregnani, M. Vivier, A. Peinnequin, C. Picq, V. Sinniger, B. Bonaz.  
*Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale chez le rat appliqué à un modèle de colite expérimentale.*  
Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive 2009, Paris, le 12 mars 2009.

J. Meregnani, D. Clarençon, S. Pellissier, V. Sinniger, C. Picq, M. Vivier, B. Bonaz.

*Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation applied to model of experimental colitis.*

16<sup>th</sup> European Gastroenterology Week, Vienne, le 21 octobre 2008.

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, C. Picq, A. Peinnequin, C. Mouret, S. Pellissier, V. Sinniger, B. Bonaz.

*The cholinergic anti-inflammatory pathway as a therapeutic target. Interest of VNS in the treatment of experimental colitis.*

6<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, Genève le 13 juillet 2008.

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, C. Picq, S. Pellissier, B. Bonaz.

*Effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale appliqué à un modèle de colite expérimentale.*

Journée de la Recherche Médicale, Grenoble, le 4 avril 2008.

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, B. Bonaz.

*Anti-inflammatory effect of vagus nerve stimulation: application to a rat model of colitis.*

8<sup>ème</sup> Colloque de la Société des Neurosciences, Montpellier, le 23 mai 2007.

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, B. Bonaz.

*Vagus Nerve Stimulation: The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway.*

European Biolapine Convention, Grenoble, le 6 octobre 2006.

J. Meregnani, D. Clarençon, M. Vivier, B. Bonaz.

*Electrostimulation vagale : la voie cholinergique anti-inflammatoire.*

Journée de la Recherche Médicale, Grenoble, le 7 avril 2006.

### **Bourse, récompense et soutien :**

Ce travail n'aurait pu être possible sans les laboratoires **UCB Pharma** qui ont su décerner l'originalité et les potentielles retombées thérapeutiques de ce projet et qui m'ont octroyé la **Bourse UCB MICI 2005**. Un grand merci à eux.

Merci aussi au Pôle des technologies médicales de Saint Etienne qui a décerné à ce projet le deuxième prix du Coup de Pouce du Pôle 2005.

Enfin l'ensemble des études effectuées a été financé par l'université Joseph Fourier, l'INSERM et la direction générale de l'armement (DGA, contrat 07co701)

# **Table des matières**

# Table des matières

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abréviations</b>                                                             | <b>17</b> |
| <b>Liste des figures</b>                                                        | <b>19</b> |
| <b>Liste des tableaux</b>                                                       | <b>20</b> |
| <b>I. Introduction</b>                                                          | <b>21</b> |
| <b>II. Synthèse bibliographique</b>                                             | <b>24</b> |
| 1 La communication entre le système nerveux central et le tube digestif         | 25        |
| <b>1.1 La communication humorale</b>                                            | <b>25</b> |
| <b>1.2 La communication nerveuse</b>                                            | <b>27</b> |
| 1.2.1 Le système nerveux intrinsèque                                            | 27        |
| 1.2.2 Le système nerveux autonome                                               | 28        |
| 2 Le nerf vague                                                                 | 31        |
| <b>2.1 Anatomie et innervation</b>                                              | <b>31</b> |
| <b>2.2 Les rôles du nerf vague</b>                                              | <b>36</b> |
| <b>2.3 Les rôles du nerf vague dans l'inflammation</b>                          | <b>37</b> |
| 2.3.1 Rôles anti-inflammatoires des afférences vagales                          | 37        |
| 2.3.2 Les efférences vagales / la voie cholinergique anti-inflammatoire         | 38        |
| 2.3.4 Pathologies et modèles expérimentaux d'inflammation traités par la VNS    | 44        |
| <b>2.4 L'électrostimulation vagale</b>                                          | <b>47</b> |
| 2.4.1 Historique de l'électrostimulation vagale                                 | 47        |
| 2.4.2 L'électrostimulation vagale aujourd'hui                                   | 49        |
| 3 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin                          | 51        |
| <b>3.1 Généralités sur l'inflammation</b>                                       | <b>51</b> |
| 3.1.1 Les lymphocytes                                                           | 51        |
| 3.1.2 Les cellules phagocytaires                                                | 52        |
| 3.2.3 les médiateurs chimiques                                                  | 53        |
| <b>3.2 Généralités sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin</b> | <b>54</b> |
| <b>3.3 Prévalence</b>                                                           | <b>55</b> |
| <b>3.4 Atteintes anatomiques</b>                                                | <b>56</b> |
| <b>3.5 Les traitements</b>                                                      | <b>56</b> |
| 3.5.1 Traitements pharmacologiques                                              | 56        |
| 3.5.2 Traitements chirurgicaux                                                  | 58        |
| <b>3.6 Modèles expérimentaux de colites</b>                                     | <b>58</b> |
| <b>III. Objectif de l'étude</b>                                                 | <b>60</b> |

|                                                                                                       |                                                                        |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>IV. 1<sup>ère</sup> partie :</b>                                                                   |                                                                        |            |
| <b>Application de l'effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale à un modèle de colite</b> |                                                                        | <b>63</b>  |
| 1                                                                                                     | Matériels et méthodes                                                  | 64         |
|                                                                                                       | <b>1.1 Animaux</b>                                                     | <b>64</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.2 Chirurgie</b>                                                   | <b>65</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.3 Groupes d'animaux</b>                                           | <b>69</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.4 Stimulation vagale</b>                                          | <b>69</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.5 Colite au TNBS</b>                                              | <b>70</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.6 Euthanasie et prélèvements</b>                                  | <b>72</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.7 Marqueurs étudiés</b>                                           | <b>72</b>  |
|                                                                                                       | 1.7.1 Par télémetrie : température corporelle et activité locomotrice  | 72         |
|                                                                                                       | 1.7.2 Poids des animaux                                                | 73         |
|                                                                                                       | 1.7.3 Surface des lésions                                              | 73         |
|                                                                                                       | 1.7.4 Analyse histologique du côlon                                    | 73         |
|                                                                                                       | 1.7.5 Quantification de l'expression de la myéloperoxydase             | 74         |
|                                                                                                       | 1.7.6 Dosage des ARNm par RT-PCR                                       | 74         |
|                                                                                                       | <b>1.8 Analyse discriminante</b>                                       | <b>76</b>  |
|                                                                                                       | <b>1.9 Les voies intracellulaires mises en jeu</b>                     | <b>77</b>  |
|                                                                                                       | 1.9.1 Anticorps                                                        | 78         |
|                                                                                                       | 1.9.2 Western blot                                                     | 78         |
|                                                                                                       | 1.9.3 Immunohistochimie                                                | 79         |
|                                                                                                       | <b>1.10 Analyses statistiques</b>                                      | <b>80</b>  |
| 2                                                                                                     | Résultats                                                              | 81         |
|                                                                                                       | <b>2.1 Télémétrie : température corporelle et activité locomotrice</b> | <b>81</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.2 Evolution du poids</b>                                          | <b>85</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.3 Surface des lésions</b>                                         | <b>86</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.4 Analyse histologique</b>                                        | <b>87</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.5 Quantification de l'expression de la myéloperoxydase</b>        | <b>89</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.6 Dosage des ARNm</b>                                             | <b>90</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.7 Index global d'inflammation</b>                                 | <b>93</b>  |
|                                                                                                       | <b>2.8 Les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu</b>    | <b>95</b>  |
|                                                                                                       | 2.8.1 Western blot                                                     | 95         |
|                                                                                                       | 2.8.2 Immunohistochimie                                                | 97         |
| 3                                                                                                     | Discussion                                                             | 99         |
| <b>IV. 2<sup>ème</sup> partie : Effets latéraux de l'électrostimulation vagale</b>                    |                                                                        | <b>108</b> |
| 1                                                                                                     | But de l'étude                                                         | 109        |
| 2                                                                                                     | Effet de l'électrostimulation vagale sur le système nerveux central    | 109        |
|                                                                                                       | <b>2.1 Matériel et méthode</b>                                         | <b>110</b> |
|                                                                                                       | 2.1.1 Animaux                                                          | 110        |
|                                                                                                       | 2.1.2 Chirurgie                                                        | 111        |
|                                                                                                       | 2.1.3 Stimulation vagale                                               | 111        |
|                                                                                                       | 2.1.4 Euthanasie et prélèvements                                       | 111        |
|                                                                                                       | 2.1.5 Immunohistochimie                                                | 112        |
|                                                                                                       | 2.1.6 Examen des lames                                                 | 112        |

|   |            |                                                                 |            |
|---|------------|-----------------------------------------------------------------|------------|
|   | <b>2.2</b> | <b>Résultats</b>                                                | <b>112</b> |
|   | <b>2.3</b> | <b>Discussion</b>                                               | <b>114</b> |
| 3 |            | Effet de l'électrostimulation vagale sur la motricité digestive | 116        |
|   | <b>3.1</b> | <b>Matériel et méthode</b>                                      | <b>116</b> |
|   | 3.1.1      | Animaux                                                         | 116        |
|   | 3.1.2      | Chirurgie et préparation des animaux                            | 117        |
|   | 3.1.3      | Stimulation, enregistrement et traitement des CMM               | 117        |
|   | <b>3.2</b> | <b>Résultats</b>                                                | <b>118</b> |
|   | <b>3.3</b> | <b>Discussion</b>                                               | <b>121</b> |
|   |            | <b>V. Conclusion et perspectives</b>                            | <b>122</b> |
|   |            | <b>VI. Annexe</b>                                               | <b>127</b> |
|   |            | <b>VII. Bibliographie</b>                                       | <b>149</b> |

# Abréviations

|        |                                                                      |
|--------|----------------------------------------------------------------------|
| ACh    | Acétylcholine                                                        |
| AChE   | Acétylcholinestérase                                                 |
| ACTH   | Hormone adrenocorticotrophique                                       |
| ADN    | Acide désoxyribonucléique                                            |
| ADP    | Adénosine di-phosphate                                               |
| ANOVA  | Analyse de variance                                                  |
| AP     | Area postrema                                                        |
| ARBP   | Acidic ribosomal phosphoprotein                                      |
| ARNm   | Acide ribonucléique messenger                                        |
| ATP    | Adénosine tri-phosphate                                              |
| CCR    | Cancer colorectal                                                    |
| ChAT   | Choline acétyltransférase                                            |
| ChE    | Cholinestérase                                                       |
| CMM    | Complexe moteur migrant                                              |
| Cp     | Crossing point                                                       |
| CRF    | Corticotropin-releasing factor                                       |
| CVD    | Complexe vagal dorsal                                                |
| CyCA   | Cyclophyline A                                                       |
| DSS    | Dextran sulfate sodium                                               |
| EEG    | Electroencéphalogramme                                               |
| H&E    | Hématoxyline éosine                                                  |
| HPRT   | Hypoxantine guanine phosphotransferase                               |
| ICAM   | Intracellular adhesion molecule                                      |
| IHC    | Immunohistochimie                                                    |
| IL     | Interleukine                                                         |
| IM     | Intramusculaire                                                      |
| IP     | Intrapéritonéale                                                     |
| IR     | Immunoréactif(ve)                                                    |
| IRMf   | Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle                      |
| LC     | Locus cœruleus                                                       |
| Jak 2  | Janus kinase 2                                                       |
| mAChR  | Muscarinic acetylcholine receptor                                    |
| MAP    | Mitogen-activated protein                                            |
| MC     | Maladie de Crohn                                                     |
| MICI   | Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin                     |
| nAChR  | Nicotinic acetylcholine receptor                                     |
| NFκB   | Nuclear factor κ B                                                   |
| NFκBIA | Nuclear factor of κ-light chain gene enhancer in B-cells inhibitor α |
| NMDV   | Noyau moteur dorsal du nerf vague                                    |
| NPB    | Noyau parabrachial                                                   |

|        |                                                     |
|--------|-----------------------------------------------------|
| NPV    | Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus           |
| NTS    | Noyau du tractus solitaire                          |
| PBS    | Tampon phosphate salin                              |
| RCH    | Rectocolite hémorragique                            |
| RT-PCR | Real time polymérase chain reaction                 |
| SNA    | Système nerveux autonome                            |
| SNC    | Système nerveux central                             |
| SNI    | Système nerveux intrinsèque                         |
| SOCS   | Suppressor of Cytokine Signalling                   |
| STAT   | Signal transducer and activator of transcription    |
| TGF    | Transforming growth factor                          |
| Th     | Lymphocyte T helper                                 |
| TM     | Domaine transmembranaire                            |
| TNBS   | Acide trinitro benzène sulfonique                   |
| TNF    | Tumor necrosis factor                               |
| UR     | Unité relative                                      |
| VGX    | Vagotomie                                           |
| VNS    | Electrostimulation vagale (Vagus nerve stimulation) |

# Liste des figures

- Figure 1** : relations neuro-immunitaires et axe corticotrope.
- Figure 2** : organisation des différentes couches de l'intestin.
- Figure 3** : organisation des systèmes nerveux sympathique et parasympathique.
- Figure 4** : vue postérieure des noyaux des nerfs crâniens dans le tronc cérébral.
- Figure 5** : schéma anatomique de l'innervation vagale.
- Figure 6** : anatomie de l'innervation vagale chez le rat.
- Figure 7** : rôle du nerf vague dans l'inflammation.
- Figure 8** : gène et structure du récepteur nAChR.
- Figure 9** : la voie cholinergique anti-inflammatoire.
- Figure 10** : signalisation intracellulaire mise en jeu par l'ACh dans le macrophage.
- Figure 11** : structure chimique de quelques agonistes cholinergiques et activateurs du nerf vague.
- Figure 12** : le Dr James Leonard Corning (1855-1923).
- Figure 13** : dispositifs de compression des carotides du Dr Corning.
- Figure 14** : dispositif de stimulation électrique transcutanée du nerf vague du Dr Corning.
- Figure 15** : chronogramme de l'expérimentation animale.
- Figure 16** : électrode animale de stimulation.
- Figure 17** : implantation chirurgicale de l'électrode de stimulation.
- Figure 18** : schéma de l'implantation de l'électrode de stimulation.
- Figure 19** : schéma de la chaîne de stimulation.
- Figure 20** : rat vigile relié au dispositif de stimulation.
- Figure 21** : schéma de la stimulation électrique.
- Figure 22** : étude radiographique du volume d'injection intracolique.
- Figure 23** : rythmes circadiens de température corporelle.
- Figure 24** : rythmes circadiens d'activité locomotrice spontanée.
- Figure 25** : évolution du poids des animaux.
- Figure 26** : analyse macroscopique des lésions.
- Figure 27** : surface moyenne des lésions au niveau du côlon distal.
- Figure 28** : photographies des tissus coliques.
- Figure 29** : expression de la MPO au niveau du côlon distal.
- Figure 30** : dosage des ARNm dans le côlon distal.
- Figure 31** : index global d'inflammation.
- Figure 32** : analyse par la méthode de western blot.
- Figure 33** : analyse par l'IHC de STAT4-P.
- Figure 34** : mécanismes d'action possibles de la VNS dans le cas de l'inflammation colique.
- Figure 35** : photographies de l'IHC du *c-fos*.
- Figure 36** : CMM chez un rat non-stimulé.
- Figure 37** : effet de la VNS sur l'électromyogramme des CMM.

# Liste des Tableaux

**Tableau 1** : modèles inflammatoires expérimentaux améliorés par la modulation de la voie cholinergique anti-inflammatoire.

**Tableau 2** : gènes étudiés et condition de la RT-PCR.

**Tableau 3**: analyse anatomopathologique des tissus coliques.

**Tableau 4** : classement des paramètres utilisés pour l'analyse discriminante selon leur importance relative dans la colite au TNBS

**Tableau 5** : activation neuronale au niveau du NTS.

**Tableau 6** : effet de la VNS sur la durée des CMM et de leurs différentes phases selon la durée de stimulation.

# **Introduction**

# Introduction

Le tractus digestif a pour fonction de transporter et dégrader les aliments ainsi que d'absorber les nutriments résultant de cette digestion. Il constitue donc la voie d'entrée des éléments utiles au métabolisme de l'organisme et est donc l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'organisme.

Tout au long du tractus digestif, différents acteurs vont permettre, par leurs interactions, le fonctionnement et le maintien l'homéostasie :

- la flore intestinale : elle comporte plusieurs milliers d'espèces de micro-organismes (bactéries essentiellement), et permet la dégradation de différents composés (cartilages et celluloses). Elle est aussi à l'origine de la synthèse de certaines substances notamment des vitamines.
- l'épithélium : il est composé de plusieurs couches cellulaires, et constitue la frontière entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'organisme. Il a pour fonction la sécrétion des différents enzymes, mais aussi la motricité digestive nécessaire au transport des aliments.
- le système immunitaire : il est constitué de nombreux types cellulaires et son rôle est de réagir à toute intrusion étrangère (parasite, bactérie, virus...) au sein de l'organisme. Il est très présent au niveau du tractus digestif du fait de la proximité du milieu extérieur (lumière et flore intestinales) et les nombreux échanges avec celle-ci.
- le système nerveux : il comporte plusieurs réseaux interconnectés, et permet le fonctionnement synchrone des différents organes digestifs (motricité, sécrétions).

Toute anomalie de fonctionnement au niveau de l'un de ces trois systèmes peut engendrer un déséquilibre qui peut induire secondairement une inflammation.

Dans le domaine de la pathologie, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la recto-colite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). En dépit d'une incidence en augmentation, l'étiopathogénie de ces maladies restent mal connue et multifactorielle, provoquant une diminution de la tolérance immunitaire face à la flore intestinale en raison d'une hyper-activation du système immunitaire. Ces maladies évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission et peuvent se

déclencher à tout âge, y compris chez l'enfant. Enfin, ces maladies constituent des facteurs à risques pour le développement de cancers.

L'objectif de ce travail a consisté à rechercher une nouvelle voie thérapeutique en étudiant les effets de l'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire par stimulation électrique du nerf vague dans un modèle de colite expérimentale chez le rat. Nous nous sommes appliqués à évaluer les bénéfices de l'effet anti-inflammatoire de cette stimulation et à étudier ses mécanismes d'action, ainsi que les effets latéraux associés, centraux et périphériques.

# **Synthèse bibliographique**

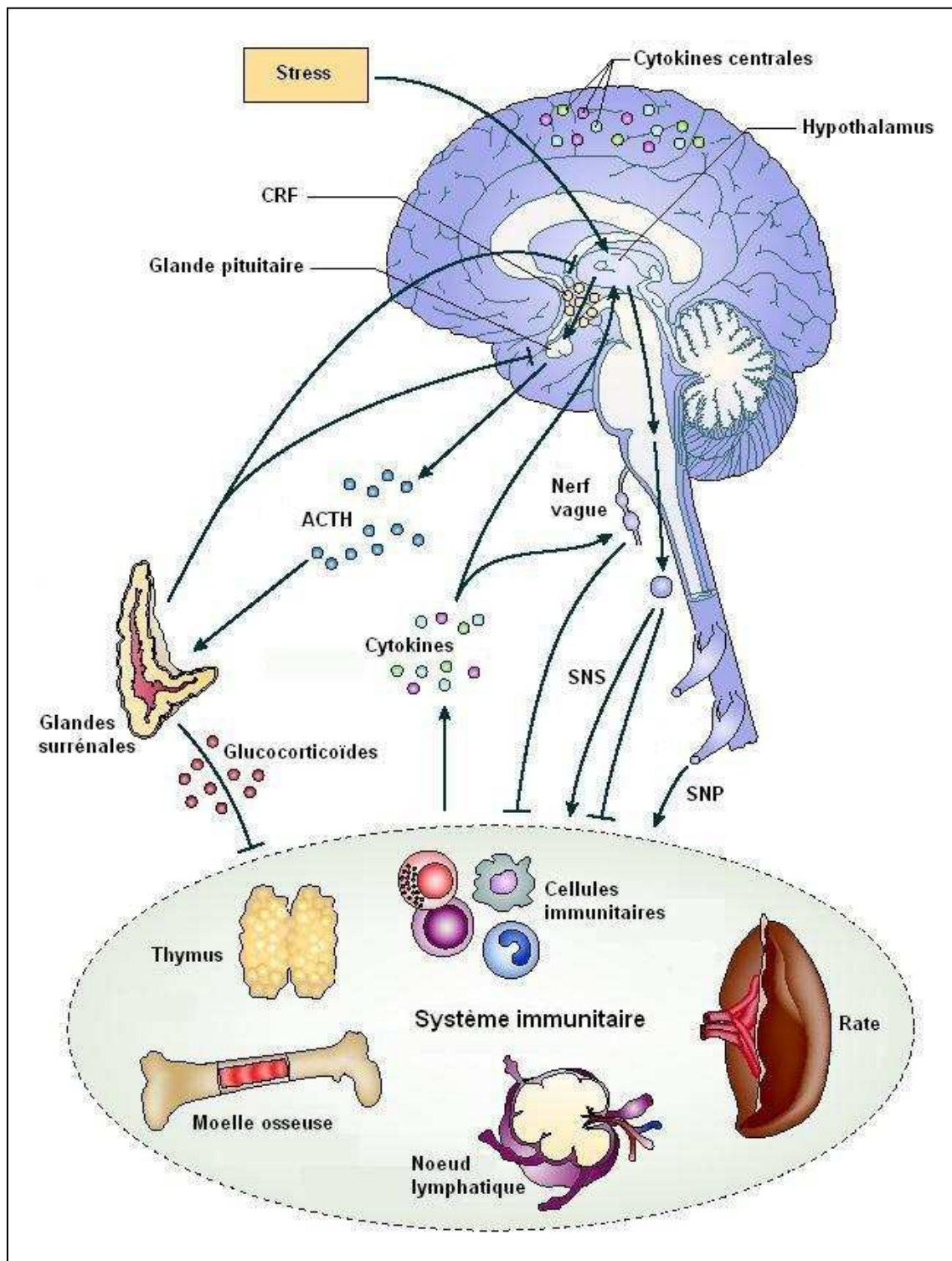
# Synthèse bibliographique

## 1 *La communication entre le système nerveux central et le tube digestif*

Il existe des échanges permanents d'informations entre le système nerveux central (SNC) et le système digestif. Cette communication passe par deux voies.

### 1.1 **La communication humorale**

Les cytokines circulantes (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) sont capables d'interagir avec le SNC (Dantzer *et al.*, 2000; Rivest *et al.*, 2000; Dantzer, 2001; Dantzer & Wollman, 2003; Dantzer, 2004). En effet, les organes circumventriculaires, situés en dehors de la barrière hémato-encéphalique sont accessibles aux cytokines (Buller, 2001). Celles-ci sont donc capables de se lier à des récepteurs de l'endothélium vasculaire de ces organes. Cette interaction aboutit à la libération de prostaglandines et de monoxyde d'azote, qui vont diffuser dans le parenchyme cérébral et moduler l'activité de groupes spécifiques de neurones qui envoient des projections notamment sur l'hypothalamus. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) sécrète alors le corticotropin-releasing factor (CRF) qui va agir sur l'hypophyse et provoquer la libération de l'hormone adrenocorticotrophique (ACTH). Cette hormone, libérée dans le sang va stimuler les glandes corticosurrénales qui vont alors sécréter les corticoïdes. Ceux-ci, notamment par une action sur l'inhibition de la phospholipase A2, vont permettre une réduction des mécanismes pro-inflammatoires : vasodilatation, migration des polynucléaires, phagocytose, activité fibroblastique. Il en résulte au final une diminution de l'inflammation. L'ensemble de cet axe anti-inflammatoire, partant du NPV est l'axe corticotrope (figure 1). Les cytokines peuvent aussi agir directement sur les afférences du nerf vague ce qui va aussi induire une activation de l'axe corticotrope (Dantzer & Kelley, 2007).



**Figure 1** : relations neuro-immunitaires et axe corticotrope (d'après Sternberg, 2006).

**ACTH** : hormone adrenocorticotrophique ; **CRF** : corticotropin-releasing factor ; **SNP** : système nerveux parasympathique ; **SNS** : système nerveux sympathique.

## 1.2 La communication nerveuse

Le système digestif est un organe d'échange entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Chez l'Homme, il représente une surface d'environ 400m<sup>2</sup> de contact avec la lumière digestive qui contient en permanence des antigènes alimentaires ainsi que des micro-organismes. Il est de ce fait important que les informations relatives à l'état de la muqueuse et du contenu luminal parviennent rapidement au niveau du SNC. Pour cela, la communication humorale, relativement lente, est complétée par une communication nerveuse plus rapide. La communication entre le tube digestif et le SNC met en jeu plusieurs réseaux neuronaux.

### 1.2.1 Le système nerveux intrinsèque

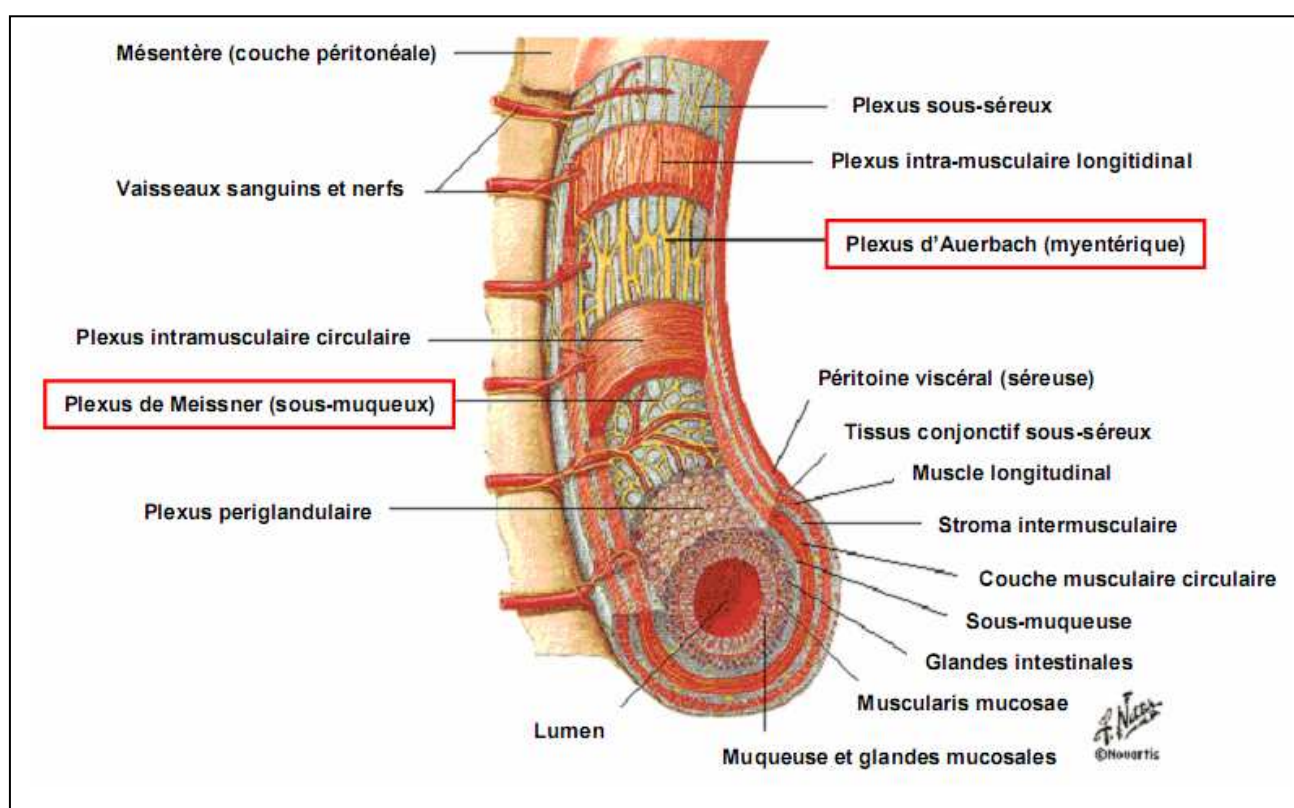
Le système nerveux intrinsèque (SNI), appelé aussi système nerveux entérique, représente un très vaste réseau nerveux puisqu'il a été établi que le SNI possédait plus de neurones que la moelle épinière elle-même (Young, 2005). Il permet à l'ensemble du système digestif de fonctionner de manière coordonnée et indépendante (Langley, 1921). En effet, tout comme le cœur possède une autonomie fonctionnelle grâce au tissu nodal, le tractus digestif est capable de fonctionner en l'absence de toute innervation extrinsèque issue du SNC grâce au SNI.

Deux plexus nerveux répartis tout au long du tube digestif constituent le SNI (figure 2) :

- le plexus sous-muqueux de Meissner, situé au niveau de la sous-muqueuse, il réalise l'innervation de la muqueuse et des glandes sécrétrices,
- le plexus myentérique d'Auerbach, situé entre les deux couches de muscles lisses circulaires dont il réalise l'innervation pour contrôler la motricité intestinale.

Ces deux plexus forment un réseau complexe de fibres. La médiation des informations nerveuses au sein du SNI est réalisée par un grand nombre de récepteurs et de neuromédiateurs différents. Les neuromédiateurs sont notamment les amines (acétylcholine, noradrénaline, sérotonine...), les purines (adénosine, ATP, ADP) ainsi que des neuropeptides (substance P, vasoactive intestinal peptide,...) (Schultzberg *et al.*, 1980). En ce qui concerne les récepteurs exprimés dans le SNI, il y a ceux correspondant à ces

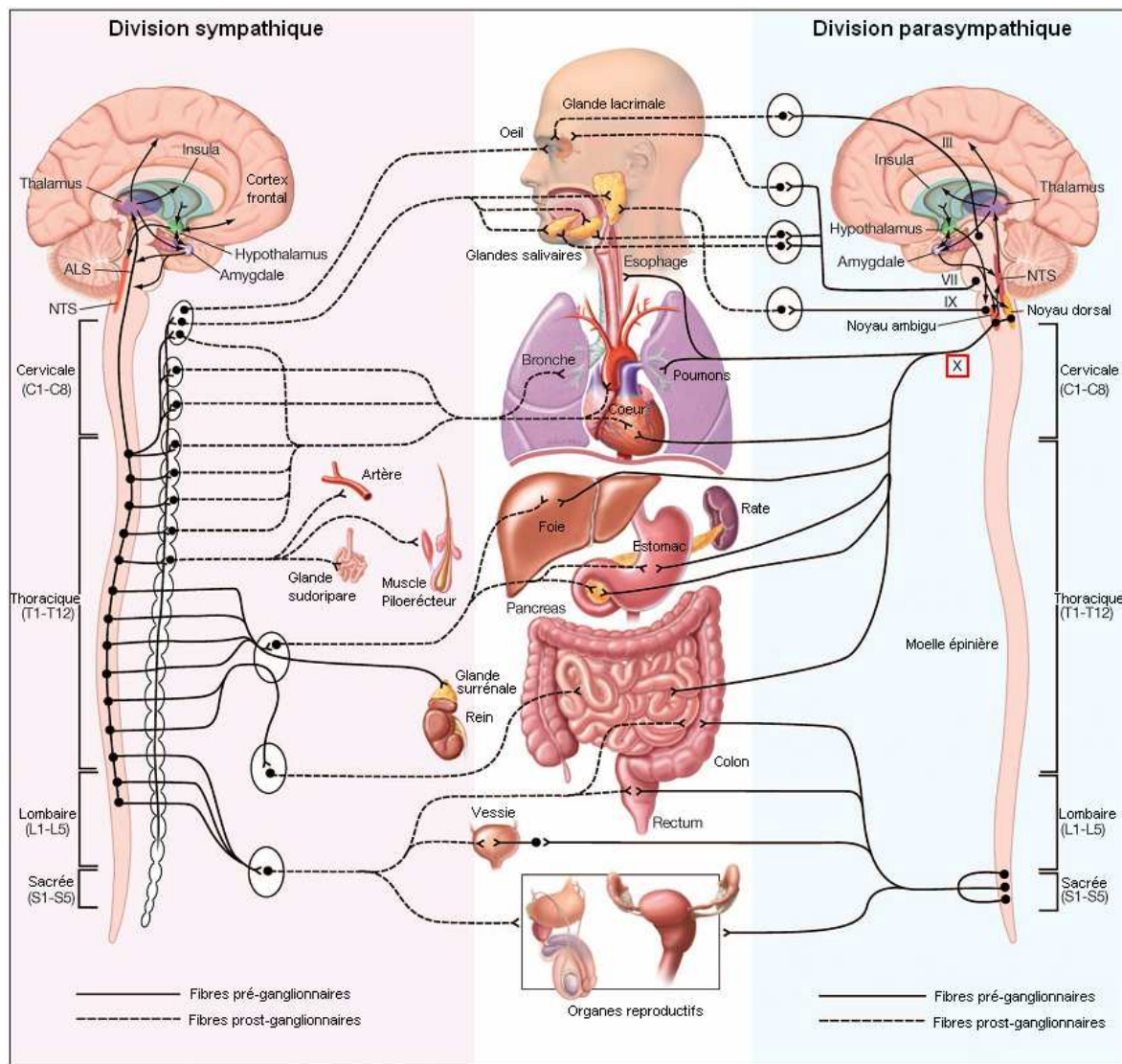
neuromédiateurs, mais aussi beaucoup de récepteurs aux sensibilités multiples (chimique, mécanique, thermique). Ces différents protagonistes permettent l'établissement des informations sensibles qui renseignent en permanence le système nerveux sur l'état du système digestif et sur le contenu luminal. En plus d'une fonction sensitive, le SNI possède aussi une fonction motrice. Les motoneurones du SNI vont réguler non seulement les fonctions motrices des muscles lisses (notamment le péristaltisme) mais aussi les fonctions sécrétrices des différentes glandes.



**Figure 2** : organisation des différentes couches de l'intestin (d'après Farr, 2002).

### 1.2.2 Le système nerveux autonome

Bien que le SNI ait la capacité de fonctionner de manière autonome, celui-ci est connecté au SNC. C'est le système nerveux autonome (SNA) qui effectue le lien entre ces deux systèmes par l'intermédiaire de fibres sympathiques et de fibres parasympathiques en provenance du SNC (figure 3) (Lane *et al.*, 2009).



**Figure 3** : organisation des systèmes nerveux sympathique et parasympathique (d'après Lane *et al.*, 2009). NTS : noyau du tractus solitaire ; ALS : système antérolatéral.

#### 1.2.2.1 Le réseau sympathique

Les fibres sympathiques innervant le SNI sont principalement issues des nerfs splanchniques et des nerfs hypogastriques. Ces fibres pré-ganglionnaires naissent au niveau spinal thoraco-lombaire (de T5 à L2) et forment des synapses cholinergiques nicotiques avec les neurones post-ganglionnaires au niveau des ganglions mésentériques et hypogastrique c'est-à-dire à distance de la paroi digestive (Lane *et al.*, 2009). Les neurones post-ganglionnaires noradrénergiques se distribuent ensuite jusqu'au côlon transverse en ce qui concerne les fibres mésentériques, et jusqu'à l'extrémité distale du tube digestif en ce qui concerne les fibres hypogastriques. L'action du système nerveux sympathique sur le tube digestif va principalement être inhibitrice par action directe sur le muscle lisse mais

surtout par inhibition de la transmission entre les neurones pré-ganglionnaires et post-ganglionnaires de la voie parasympathique excitatrice. Il est intéressant de remarquer que les effets du système sympathique sont au contraire, excitateurs au niveau cardiovasculaire, où ils vont être à l'origine d'une augmentation de l'activité cardiaque et de la pression sanguine.

Les principaux neuromédiateurs du système sympathique sont des catécholamines comme l'épinéphrine et la noradrénaline. Ces neuromédiateurs agissent sur les récepteurs adrénergiques (ou adrénorécepteurs) dont il existe cinq types différents ( $\alpha 1-2$ ,  $\beta 1-3$ ).

#### *1.2.2.2 Le réseau parasympathique*

Les fibres parasympathiques sont issues de deux contingents. Le contingent spinal provenant de la moelle sacrée constitue les nerfs pelviens. Il innerve une partie relativement faible du tube digestif c'est-à-dire du côlon gauche au rectum. Le contingent parasympathique effectuant la majorité de l'innervation digestive est originaire du nerf vague.

Le système parasympathique va exercer un rôle majoritairement moteur et excitateur, opposé au système sympathique et un effet inhibiteur au niveau cardiovasculaire. Le neuromédiateur principal est l'acétylcholine (ACh), qui va agir sur des récepteurs nicotiniques et muscariniques.

Il est intéressant de souligner que dans le cas des MICI, des déséquilibres entre le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique ont été décrits. Des diminutions d'activités du système parasympathique ont en effet été mises en évidence (Sharma *et al.*, 2009).

## 2 Le nerf vague

### 2.1 Anatomie et innervation

Le nerf vague est un nerf mixte composé d'environ 20% de fibres efférentes et 80% de fibres afférentes (Lane *et al.*, 2009; Van Der Zanden *et al.*, 2009a). Il est appelé aussi nerf pneumogastrique, nerf cardio-pneumo-entérique, nerf parasympathique ou encore nerf X puisqu'il constitue la 10<sup>ème</sup> paire des nerfs crâniens. C'est aussi le plus long des nerfs crâniens. Le principal neuromédiateur de ce nerf est l'ACh. Le nerf vague est directement relié à plusieurs noyaux centraux situés dans le tronc cérébral (figure 4) :

- le noyau ambigu, noyau somato-moteur, partagé avec le nerf glossopharyngien (IX), centre moteur du nerf vague contenant les noyaux des fibres broncho-motrices viscérales,
- le complexe vagal dorsal (CVD), composé du noyau moteur dorsal du vague (NMDV), du noyau du tractus solitaire (NTS) et de l'area postrema (AP).

Le NMDV est la principale source de fibres parasympathiques du tronc cérébral. Les fibres efférentes partant du NMDV sont viscéromotrices. Elles innervent les neurones post-ganglionnaires du pharynx, du larynx et les muscles lisses des viscères thoraciques et abdominaux. Le NMDV reçoit des influx nerveux en provenance de plusieurs régions cérébrales éloignées, notamment l'hypothalamus (NPV) mais aussi très proches comme le NTS.

Le NTS est le centre de convergence des afférences vagales qui amènent les informations d'origine périphérique, il est donc principalement sensitif. A partir du NTS des projections secondaires sont réalisées vers le NMDV, mais aussi sur le noyau parabrachial (NPB) et le NPV. Au niveau du NPV, les fibres provenant du NTS arrivent plus précisément dans la zone responsable de la libération du CRF (Sawchenko & Swanson, 1982).

Chez l'Homme, l'origine apparente du nerf vague se situe au niveau du sillon collatéral postérieur du bulbe, entre le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf spinal (XI ou encore nerf accessoire) (figures 4 et 5) (Netter, 2007). Le nerf vague quitte ensuite le crâne via le foramen jugulaire (ou trou déchiré postérieur) tout comme les nerfs crâniens IX et XI ainsi que la veine jugulaire interne et l'artère méningée postérieure.

Le nerf vague entre dans la région rétro-stylienne et latéro-pharyngée où il va former deux ganglions (figure 5) :

- le ganglion supérieur ou ganglion jugulaire, contenant les corps cellulaires de la sensibilité générale des rameaux méningés et auriculaires,
- le ganglion inférieur ou ganglion plexiforme, plus volumineux, contenant les corps cellulaires des fibres sensitives viscérales et gustatives (NguyenHuu *et al.*, 1999).

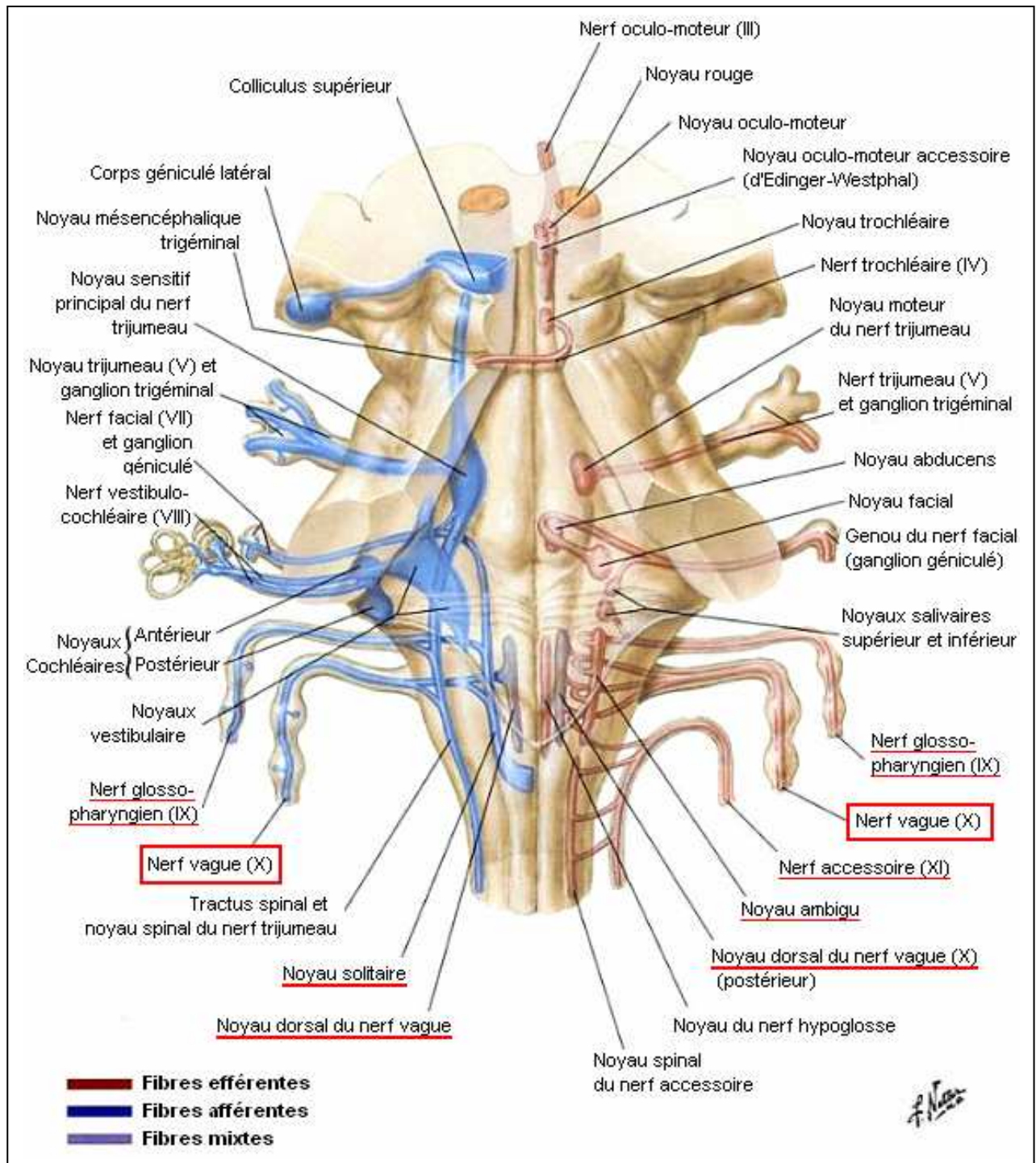
Le nerf vague se poursuit au niveau cervical dans la région carotidienne aux abords des gros vaisseaux.

Au niveau thoracique, les nerfs vagues gauche et droit vont tout deux donner des ramifications à destination des :

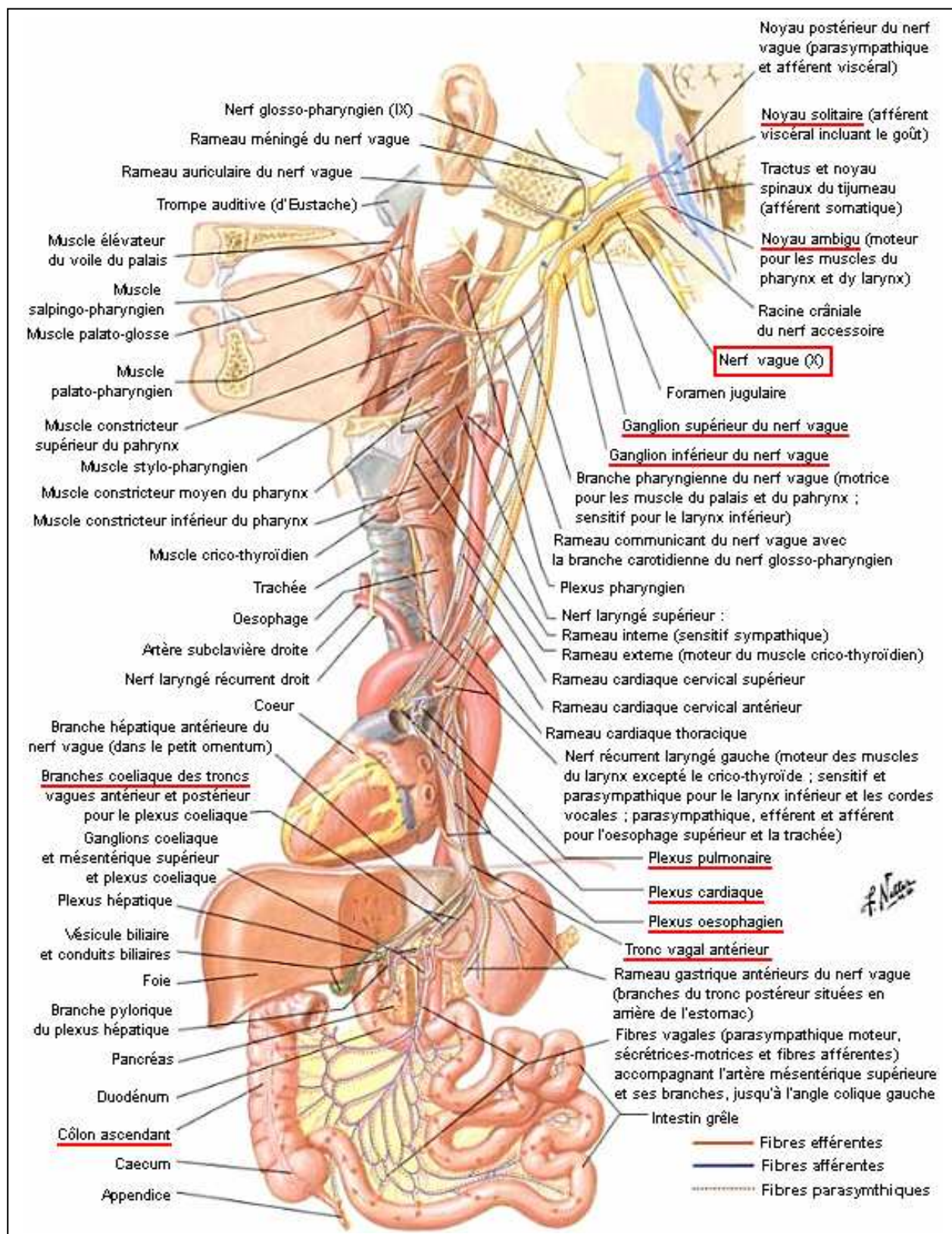
- plexus cardiaque : il faut toutefois souligner que, même si le cœur reçoit des fibres des nerfs vagues gauche et droit, c'est principalement les fibres vagues droites qui vont innover le nœud sino-atrial. Le nerf vague gauche pour sa part va préférentiellement innover le nœud atrio-ventriculaire. L'activité cardiaque est donc principalement modulée par le nerf vague droit (Randall & Ardell, 1985).
- plexus pulmonaire desservant le poumon mais aussi les bronches,
- plexus œsophagien innervant l'œsophage.

Ensuite, les deux troncs principaux des nerfs vagues gauche et droit vont s'entremêler et ainsi former les troncs vagues antérieur et postérieur. Ceux-ci contiennent donc des fibres en provenance des nerfs vagues gauche et droit (Marieb, 2005). Ces troncs descendent ensuite le long de l'œsophage pour atteindre la cavité abdominale et vont émettre plusieurs plexus à destination des viscères abdominaux (figure 5) :

- le plexus cœliaque ou plexus solaire d'où partent des fibres nerveuses à destination de l'estomac, du foie et de la rate (Moore & Dalley, 2001).
- le plexus mésentérique supérieur d'où va être issu l'innervation de l'intestin grêle, du côlon, du caecum et du pancréas.
- le plexus hypogastrique donnant des fibres nerveuses allant au côlon, à la vessie, aux organes génitaux et au rectum (Marieb, 2005).

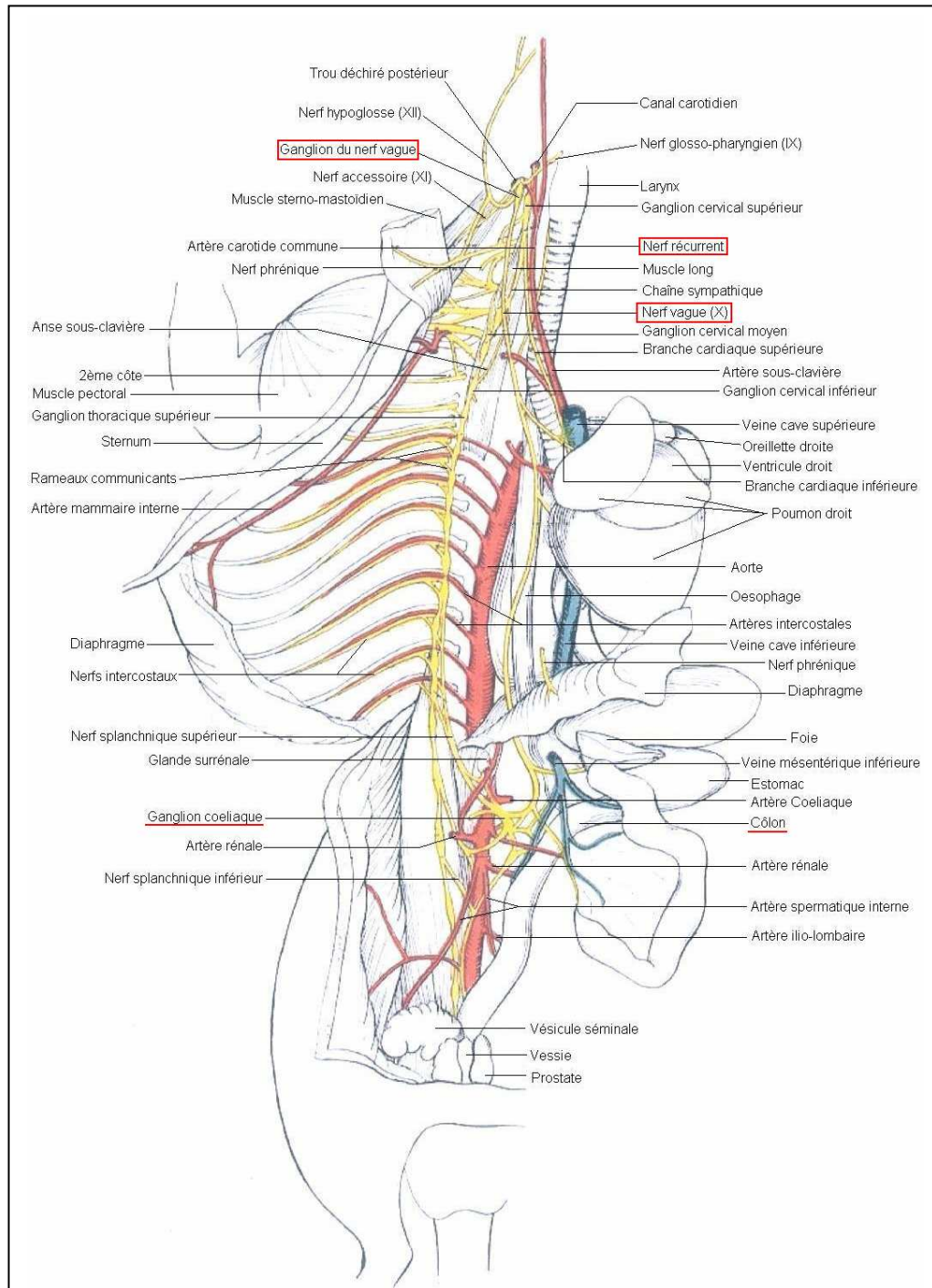


**Figure 4** : vue postérieure (en transparence) des noyaux des nerfs crâniens dans le tronc cérébral (d'après Netter, 2007).



**Figure 5** : schéma anatomique de l'innervation vagale (d'après Netter, 2007).

En ce qui concerne l'anatomie du nerf vague chez le rat, le parcours ainsi que la position de certains ganglions et décussations diffèrent mais il existe malgré toute une grande homologie (figure 6) (Greene, 1963).



**Figure 6** : anatomie de l'innervation vagale chez le rat (d'après Greene, 1963).

Chez le rat, il a été démontré que le nerf vague innerve l'ensemble du côlon (Altschuler *et al.*, 1993). En revanche, chez l'Homme, l'innervation vagale du côlon est encore discutée. Certaines études indiquent que l'innervation colique par le nerf vague se termine au niveau du côlon transverse (figure 5), l'innervation parasympathique serait ensuite réalisée par le nerf parasympathique sacré, provenant de la moelle épinière sacrée (S1-S4) (figure 3) (Netter, 2007). D'autres études indiquent que le nerf vague pourrait projeter des fibres sur l'ensemble du côlon y compris le côlon gauche (Ribet, 1952).

L'innervation splénique par le nerf vague semble elle aussi varier entre les deux espèces, puisque contrairement à ce qui est décrit chez l'Homme, chez le rat, la rate semble être innervée directement par le nerf vague (Buijs *et al.*, 2008).

Enfin il faut souligner que les variations anatomiques chez l'Homme sont nombreuses. Ainsi beaucoup de variations de l'innervation vagale peuvent être décrites selon les études, notamment à travers les dénervations sélectives qui mettent en évidence des rameaux vagues inconstants (Kamina, 2009).

## **2.2 Les rôles du nerf vague**

Le nerf vague possède plusieurs fonctions, il est moteur, sensitif, végétatif et anti-inflammatoire. Il a tout d'abord un rôle moteur véhiculé par ses efférences. Ce rôle moteur s'exerce sur un grand nombre d'organes : cœur, poumons, palais, pharynx, larynx, trachée, bronches, estomac, intestin grêle et côlon. Il va notamment contrôler les sécrétions gastriques et biliaires. Au niveau du cœur, le nerf vague va être inhibiteur et son activité va se traduire par une diminution du rythme et de la fréquence cardiaque, c'est-à-dire un effet chronotrope négatif. Au contraire, au niveau du tube digestif, le nerf vague va plutôt avoir un effet stimulant puisqu'il va augmenter le péristaltisme et la sécrétion gastrique. Il faut aussi souligner que, par l'intermédiaire de ses fibres broncho-motrices qui vont donner le nerf récurrent, le nerf vague est le nerf de la phonation.

Les afférences vagales vont avoir plusieurs fonctions. La première concerne naturellement le transport des informations sensibles. La sensibilité du nerf vague concerne la muqueuse du larynx et du laryngo-pharynx. Le nerf vague véhicule aussi des informations concernant la gustation jusqu'aux noyaux gustatifs contenus au sein du faisceau solitaire. La viscéro-sensibilité concerne l'appareil cardio-vasculaire par le biais des fibres en provenance des parois carotidiennes et aortiques qui vont permettre les

réflexes végétatifs d'adaptation de la tension artérielle et du rythme cardiaque. Enfin, au niveau du tube digestif, le nerf vague va être responsable de la transmission de l'ensemble des informations non douloureuses, comme la température ou le volume du contenu luminal digestif.

## **2.3 Les rôles du nerf vague dans l'inflammation**

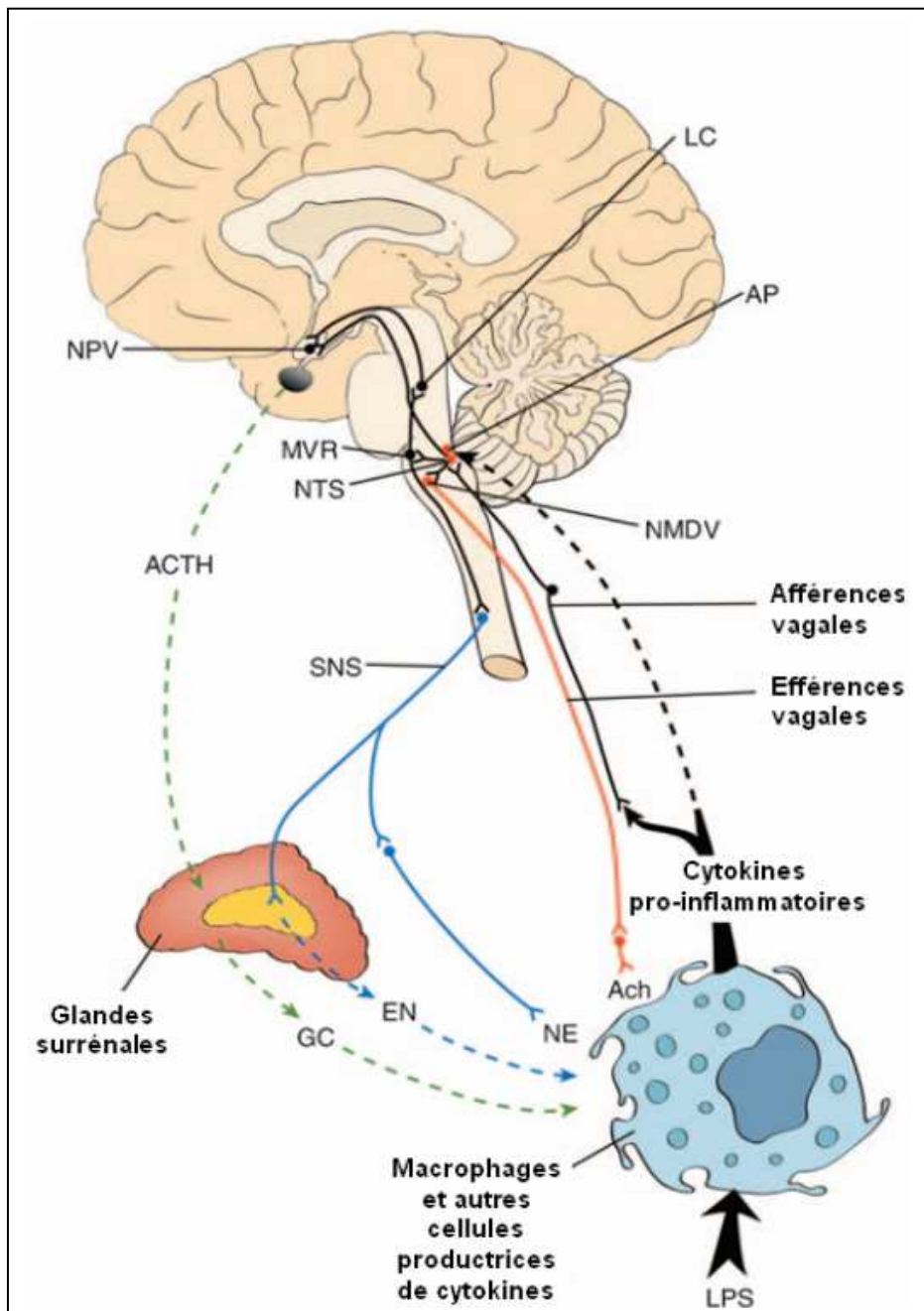
En plus de ce rôle dans la motricité et la sensibilité, le nerf vague joue un double rôle dans l'inflammation. Le plus connu est celui mettant en jeu les afférences vagales centripètes, le deuxième quant à lui est de découverte plus récente et fait intervenir les efférences vagales centrifuges.

### **2.3.1 Rôles anti-inflammatoires des afférences vagales**

Les afférences vagales ont aussi pour fonction de signaler au SNC les phénomènes inflammatoires qui se produisent à la périphérie. Il existe pour cela des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) au niveau de ces afférences (Gaykema *et al.*, 1995; Dantzer & Kelley, 2007). Des expériences de vagotomies sélectives dans le cas de modèles d'inflammation systémique ont permis de mettre en évidence cette propriété des afférences vagales. Il a ainsi été démontré que la vagotomie sous-diaphragmatique entraînait une suppression de l'activation des neurones responsables de la sécrétion du CRF au niveau du NPV et donc une diminution de l'activation de l'axe corticotrope (figure 7) (Laye *et al.*, 1995; Bluthé *et al.*, 1996).

Les informations concernant le processus d'inflammation en cours arrivent au niveau des neurones noradrénergiques A2 du NTS (Sawchenko & Swanson, 1982). Dès lors, deux actions visant à moduler l'inflammation vont pouvoir se mettre en place. La première voie, connue depuis plusieurs décennies va consister à activer l'axe corticotrope par l'intermédiaire des projections qui se font entre le NTS et le NPV (figure 7) (Sawchenko & Swanson, 1982; Rivest *et al.*, 2000).

La deuxième action est l'activation des efférences vagales et de la voie cholinergique anti-inflammatoire.



**Figure 7** : rôle du nerf vague dans l'inflammation (d'après Pavlov *et al.*, 2003).

**ACh** : acétylcholine ; **ACTH** : hormone adrenocorticotrophique ; **AP** : area postrema ; **EN** : épinéphrine ; **GC** : glucocorticoïdes ; **LC** : locus coeruleus ; **LPS** : lipopolysaccharide (endotoxine) ; **MVR** : moelle ventrolatérale rostrale ; **NMDV** : noyau moteur dorsal du nerf vague ; **NE** : norépinéphrine ; **NPV** : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; **NTS** : noyau du tractus solitaire, **SNS** : système nerveux sympathique.

### 2.3.2 Les efférences vagales / la voie cholinergique anti-inflammatoire

Ce n'est que plus récemment que l'existence d'une autre voie vagale de modulation de la réponse inflammatoire systémique et locale a été mise en évidence par le groupe du Pr Tracey (Borovikova *et al.*, 2000b). Cette nouvelle voie vagale anti-

inflammatoire, complémentaire de l'axe corticotrope, fait intervenir les efférences vagales (Pavlov *et al.*, 2003). Celles-ci vont en effet être activées après que le NTS ait reçu les influx issus des afférences vagales. Ce réflexe est par conséquent appelé réflexe vago-vagal.

L'activation des efférences vagales va provoquer au niveau périphérique une libération d'ACh qui aura pour conséquence la réduction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (figure 7).

#### 2.3.2.1 Le système cholinergique

##### a. Les composants du système cholinergique

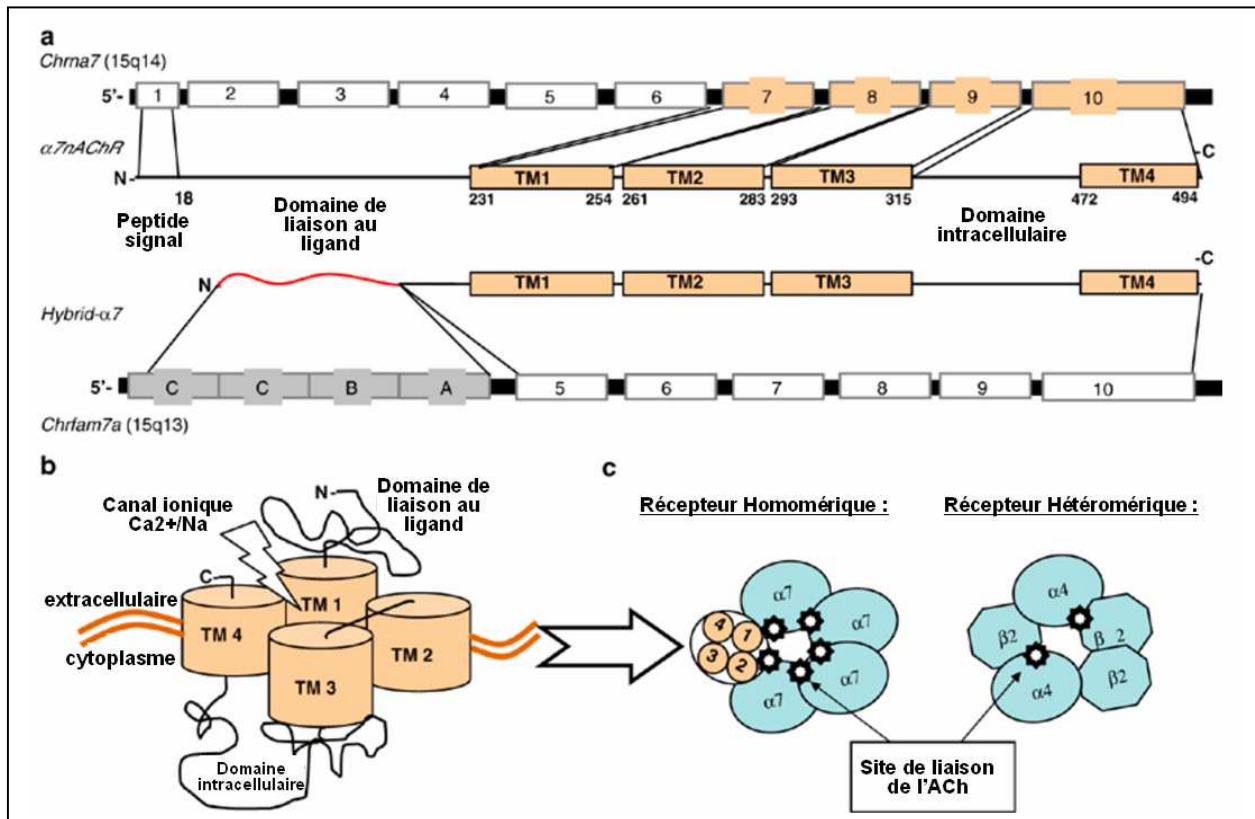
Le système cholinergique comporte comme médiateur principal l'ACh et est composé de récepteurs nicotiniques (nAChR) et muscariniques (mAChR).

Actuellement, 17 sous-unités des récepteurs nicotiniques ont été décrites chez le vertébré. Les nAChR sont classés en sous-unités de types  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\varepsilon$  (Lukas *et al.*, 1999). Il existe 10 sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 1$ -  $\alpha 10$ ), 4 sous-unités  $\beta$  ( $\beta 1$ -  $\beta 4$ ) et une seule sous-unité pour les 3 types restant ( $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\varepsilon$ ). Toutes ces sous-unités partagent des propriétés structurales communes : une région N-terminale extracellulaire avec 13 acides aminés entre 2 cystéines formant un pont disulfure, 4 segments transmembranaires (M1-M4) avec une boucle cytoplasmique entre M3 et M4 contenant une séquence propre à chaque sous-unité, et enfin une partie C-terminale extracellulaire. Chaque type de sous-unité possède ensuite des propriétés qui lui sont propres, par exemple l'ensemble des sous-unités  $\alpha$  possède une paire de cystéines en tandem au niveau N-terminal.

Les récepteurs nAChR sont constitués d'un assemblage de 5 sous-unités (figure 8). Ce sont généralement des hétéro-pentamères, constitués de plusieurs sous-unités différentes. En effet, seules les sous-unités  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  peuvent s'associer entre elles pour former des homo-pentamères fonctionnels. Les nAChR sont ionotropes, ces canaux ioniques ligand-dépendants, vont en présence d'ACh, permettre un flux d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Les récepteurs muscariniques sont composés de cinq sous-types ( $\text{M}_1$ - $\text{M}_5$ ). Ils font quant à eux partie des récepteurs métabotropes. Contrairement aux nAChR, ils ne vont pas être à l'origine de flux ioniques mais grâce à leur couplage avec les protéines G, ils sont à l'origine d'activations de cascades de signalisations intracellulaires.

Le système cholinergique est enfin constitué d'enzymes de synthèse et de dégradation. Les cholines acétyltransférases (ChAT) et les cholinestérases (ChE) sont respectivement à l'origine de la synthèse et du métabolisme de l'ACh (Lukas *et al.*, 1999; Kawashima *et al.*, 2007).



**Figure 8** : gène et structure du récepteurs nAChR (d'après de Jonge & Ulloa, 2007).

**a** : gène codant pour le récepteur nAChR  $\alpha 7$  ; **b** : structure tridimensionnelle d'un récepteur nAChR ; **c** : sites de liaison de l'ACh sur les récepteurs nAChR homomériques et hétéromériques. **TM** : domaine trans-membranaire.

### *b. Le système cholinergique central*

Au niveau central, le réseau cholinergique implique de nombreuses aires cérébrales. En effet, l'hippocampe, l'hypothalamus ainsi que le cortex cérébral reçoivent des fibres nerveuses cholinergiques (Benarroch, 1993; Levey, 1996). Il semble que les structures cholinergiques centrales soient, pour la plupart, impliquées dans la régulation de l'activité vagale (Gotoh *et al.*, 1989; Pavlov *et al.*, 2006; Pavlov *et al.*, 2009). Des expériences ont en effet montré que l'injection intra-ventriculaire d'inhibiteurs des AChE

comme la galantamine, induisait une augmentation de l'activité vagale (Pavlov *et al.*, 2009).

#### *c. Le système cholinergique périphérique*

Le système cholinergique est aussi très représenté en dehors du SNC et notamment au niveau de la jonction neuromusculaire. L'ACh est en effet le principal médiateur responsable de la transmission des informations motrices entre le système nerveux et le muscle, c'est le neuromédiateur libéré au niveau de la plaque motrice (Lukas *et al.*, 1999).

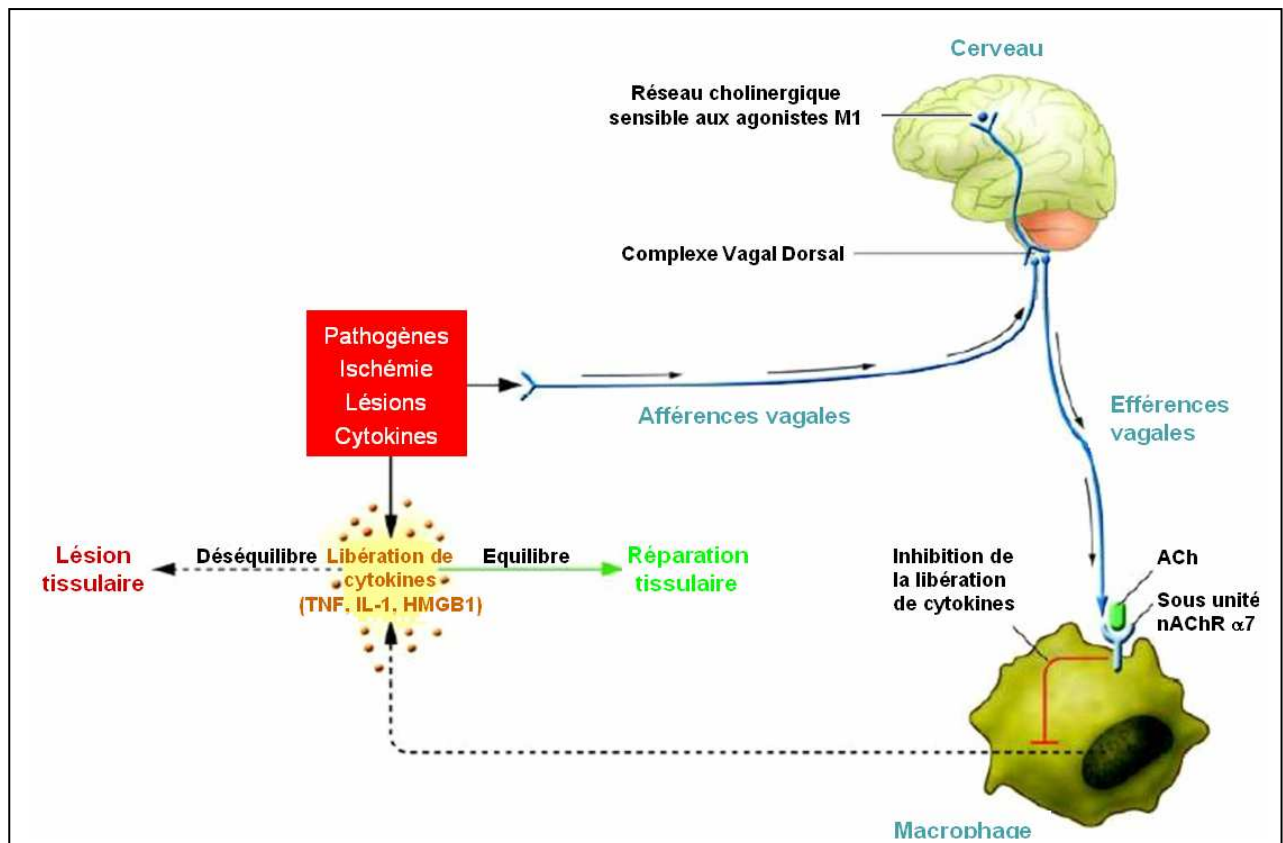
Cependant, le système cholinergique est aussi exprimé par un grand nombre de cellules qui ne sont ni nerveuses ni musculaires, et notamment au niveau du système immunitaire. Les études portant sur le système cholinergique immunitaire sont relativement nombreuses. Toutes n'abondent pas dans le même sens puisque l'expression des différents composants est très variable pour un même type cellulaire en fonction de son état de différenciation ou d'activation, mais aussi en fonction de sa localisation tissulaire. Il est clair, malgré tout, qu'un grand nombre de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques, cellules T) expriment des composants du système cholinergique, c'est-à-dire les récepteurs mAChR et nAChR, la ChAT ainsi que l'AChE (Wang *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2007; Wessler & Kirkpatrick, 2008; Van Der Zanden *et al.*, 2009a). C'est aussi le cas des différentes cellules constituant l'épithélium digestif où l'expression de plusieurs protagonistes du système cholinergique a été observée, notamment au niveau des cellules épithéliales coliques ou encore des cellules glandulaires (Wessler & Kirkpatrick, 2008).

#### *2.3.2.1 Effet anti-inflammatoire des efférences vagales*

Il est admis que l'activation des efférences vagales peut avoir un effet anti-inflammatoire périphérique. Cependant, les mécanismes exacts mis en jeu sont encore très discutés. Le site d'action précis demeure encore inconnu, et deux hypothèses sont proposées :

- un effet anti-inflammatoire local, induit par une innervation vagale directe et une action par le nerf vague sur les cellules immunitaires,
- un effet anti-inflammatoire systémique par l'intermédiaire d'une action du nerf vague directe ou non sur la rate. En effet, cet organe, en plus de ses propriétés

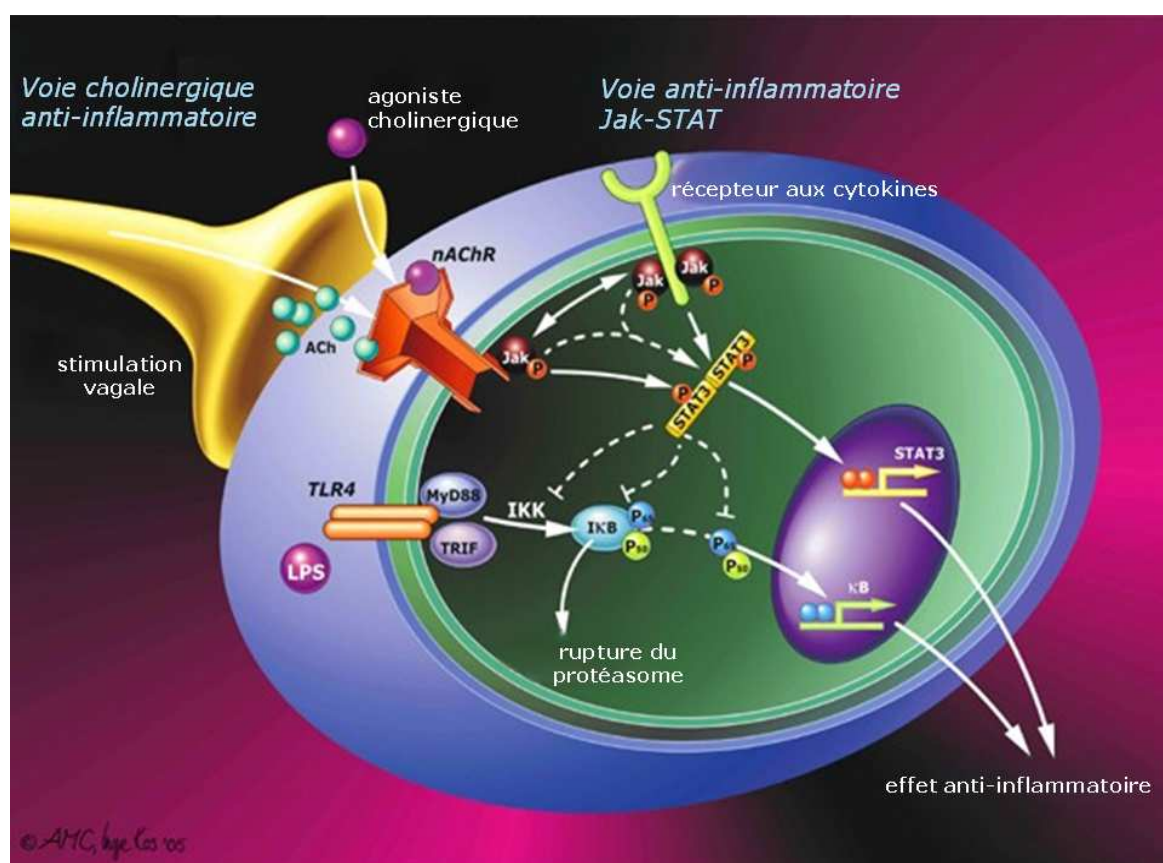
de filtration et d'épuration du sang, est impliqué dans le contrôle de l'immunité. Des études ont montré que la splénectomie annulait la modulation de l'inflammation par la voie cholinergique anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation systémique (Huston *et al.*, 2006).



**Figure 9** : la voie cholinergique anti-inflammatoire (à partir de Tracey, 2007).

Enfin, les incertitudes demeurent en ce qui concerne les cellules immunitaires, les AChR, et les voies intracellulaires mises en jeu (Van Der Zanden *et al.*, 2009a). L'hypothèse la plus répandue fait intervenir la sous-unité nAChR  $\alpha 7$  présente à la surface des macrophages (Figure 9). Des études ont en effet montré que l'ACh diminue de manière dose-dépendante la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-18) par les macrophages humains stimulés *in vitro* par des endotoxines (Borovikova *et al.*, 2000b). De plus, des études *in vivo* ont aussi montré cet effet de modulation de la sécrétion pro-inflammatoire des macrophages, et cela dans plusieurs modèles expérimentaux d'inflammation. Les voies de signalisation intracellulaires activées par le

nAChR  $\alpha 7$  impliquent les protéines Jak2/STAT3 (janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3) et NF $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$  B) (Figure 10) (de Jonge *et al.*, 2005; Tracey, 2007). En effet, la fixation de l'ACh au niveau du récepteurs nAChR va induire une activation de la protéine STAT3 qui va alors agir d'une part comme facteur de croissance et activer l'expression de gènes de protéines anti-inflammatoires et d'autre part en inhibant le facteur de transcription NF $\kappa$ B qui joue une part importante dans l'activation macrophagique et la sécrétion pro-inflammatoire en agissant sur différents promoteurs géniques (Figure 10). Enfin de récentes études montrent que d'autres récepteurs cholinergiques peuvent être mis en jeu par la voie cholinergique anti-inflammatoire, notamment le récepteur  $\alpha 4\beta 2$ , par l'intermédiaire duquel l'ACh peut moduler l'activité phagocytaire des macrophages (van der Zanden *et al.*, 2009b).



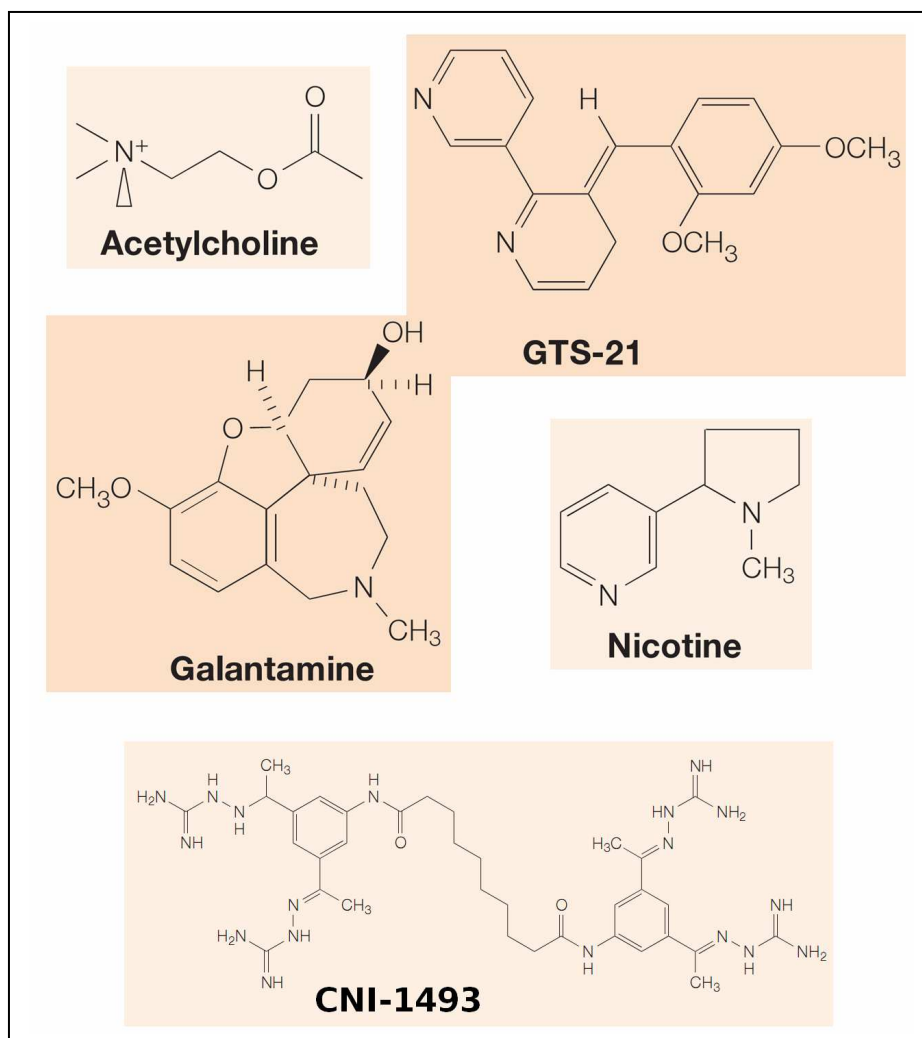
**Figure 10** : signalisation intracellulaire mise en jeu par l'ACh dans le macrophage (d'après de Jonge & Ulloa, 2007).

Cependant, d'autres études (Rosas-Ballina *et al.*, 2008), mais aussi l'importance de l'expression des composants du système cholinergique (ACh, ChAT, AChE) laissent penser

que le macrophage n'est pas l'unique cellule immunitaire cible de la modulation de l'inflammation via l'ACh. De plus, les efférences vagales pourraient aussi exercer leur rôle anti-inflammatoire de manière indirecte via l'activation du système paraganglionnaire. Dans ce cas, le nerf vague aurait pour effet d'activer les fibres du ganglion mésentérique coeliaque supérieur. Il aurait ainsi la capacité d'exercer un effet anti-inflammatoire par l'intermédiaire de la stimulation du nerf splénique, catécholaminergique (Rosas-Ballina *et al.*, 2008). Dans ce cas, ce n'est plus l'ACh, mais les catécholamines, libérées au niveau splénique, qui agiraient sur les cellules immunitaires.

#### 2.3.4 Pathologies et modèles expérimentaux d'inflammation traités par la VNS

L'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire a été réalisée de manière pharmacologique. En effet, plusieurs agonistes cholinergiques ou substances anti-AChE ont été testés. Bien entendu, dans un premier temps, la nicotine a été utilisée mais celle-ci provoquant certains effets secondaires (nausées, insomnies, céphalées) (Louvet *et al.*, 1999), d'autres molécules, plus sélectives du nAChR  $\alpha 7$  notamment, ont été utilisés pour l'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire : GTS21, galantamine, 4OHGTS, AR-R17779, CAP55, Exo2, PNU-282987... (Figure 11 et tableau 1) (Borovikova *et al.*, 2000a; Ulloa, 2005; Pavlov *et al.*, 2007; Oke & Tracey, 2008; Van Der Zanden *et al.*, 2009a).



**Figure 11** : structure chimique de quelques agonistes cholinergiques et activateurs du nerf vague (Ulloa, 2005).

L'injection centrale ou périphérique de CNI-1493, guanylylhydrazone tétravalent (figure 11), induit des décharges vagales comparables à celles provoquées par la VNS. Ce traitement pharmacologique confère des effets anti-inflammatoires via une activation de la voie cholinergique à la fois dans l'inflammation locale et systémique (Ulloa, 2005; Oke & Tracey, 2008). Ainsi des animaux prétraités par des injections intraveineuses de CNI-1493 présentent des diminutions dose-dépendantes des cytokines pro-inflammatoires systémiques (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et ce traitement a la faculté de prévenir le développement du choc septique (Bernik *et al.*, 2002b). Le mode d'action exact de cette molécule n'est pas encore totalement élucidé, mais il passerait par l'inhibition de la phosphorylation de la MAP (mitogen activated protein) kinase p38, très impliquée dans la traduction des ARNm des cytokines pro-inflammatoires (Oke & Tracey, 2008).

L'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire a aussi été réalisée par l'intermédiaire de la VNS (tableau 1). Le plus souvent, ces stimulations sont obtenues grâce à des électrodes implantées au niveau de la portion cervicale du nerf vague gauche. La plupart des expériences induisant une activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire par la VNS ont été réalisées de manière aiguë. La stimulation du nerf vague a été effectuée de manière non répétée et sur l'animal anesthésié (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Guarini *et al.*, 2003; The *et al.*, 2007).

D'une part, des stimulations ont été pratiquées sur des nerfs vagues sectionnés au-dessus de l'électrode de manière à ne stimuler que les efférences vagales. Ainsi, le maintien de l'effet anti-inflammatoire, obtenu dans ces conditions, n'implique que la mise en jeu des efférences vagales.

D'autre part, des travaux ont montré que l'effet anti-inflammatoire de la VNS était annulé par la vagotomie en aval de l'électrode de stimulation, corroborant ainsi les premières études en montrant que l'effet anti-inflammatoire obtenu par la VNS n'impliquait pas les afférences vagales (Borovikova *et al.*, 2000b). L'effet de la VNS passerait donc principalement par le recrutement des efférences vagales et l'activation de la voie cholinergique anti-inflammatoire.

Enfin, des études ont aussi montré, par l'intermédiaire de vagotomies, le rôle bénéfique de l'intégrité du nerf vague dans plusieurs modèles d'inflammation (tableau 1) (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Guarini *et al.*, 2003; Ghia *et al.*, 2006; van Westerloo *et al.*, 2006; Ghia *et al.*, 2007).

Dans le cas de la colite expérimentale, il est intéressant de souligner que de précédentes expériences (Miceli & Jacobson, 2003) ont montré que l'injection sous-cutanée d'anti-AChE atténuait, de façon significative, les phénomènes inflammatoires au niveau du côlon dans un modèle de colite expérimentale. Ces données sont donc en faveur d'un rôle protecteur du système cholinergique dans le modèle de colite.

La voie cholinergique anti-inflammatoire pourrait donc être une cible thérapeutique dans le domaine des MICI, soit par une approche pharmacologique, utilisant des agonistes cholinergiques, agissant notamment sur la sous-unité  $\alpha 7$  du récepteur nicotinique, soit par une approche, plus originale et électrophysiologique, faisant appel à la libération sélective d'ACh, à l'extrémité des efférences vagales, par la VNS.

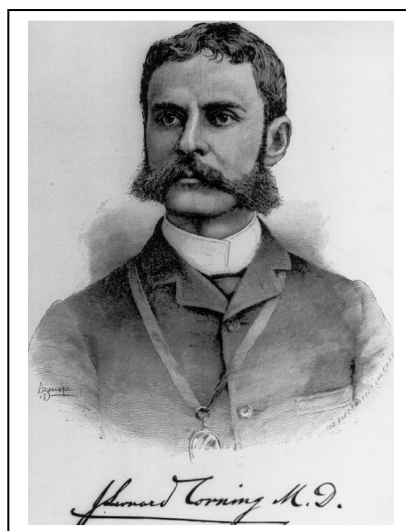
| Modèle inflammatoire   | Espèce | Modalités de modulation de la voie cholinergique | Auteurs et année                                     |
|------------------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Sepsis                 | Rat    | VNS / Nicotine / VGX                             | Borovikova <i>et al.</i> , 2000b                     |
| Ischémie / reperfusion | Rat    | VNS / CNI-1493 / VGX                             | Bernik <i>et al.</i> , 2002a                         |
| Choc hémorragique      | Rat    | VNS / VGX                                        | Guarini <i>et al.</i> , 2003                         |
| Colite                 | Souris | Inhibiteur ChE / VGX                             | Miceli & Jacobson, 2003<br>Ghia <i>et al.</i> , 2006 |
| Péritonite             | Souris | Nicotine / VGX                                   | van Westerloo <i>et al.</i> , 2005                   |
| Arthrite               | Souris | Nicotine / CAP55                                 | Saeed <i>et al.</i> , 2005                           |
| Pancréatite            | Souris | GTS-21 / VGX                                     | van Westerloo <i>et al.</i> , 2006                   |
| Iléus post-opératoire  | Souris | VNS / AR-R17779                                  | The <i>et al.</i> , 2007                             |

**Tableau 1** : modèles inflammatoires expérimentaux améliorés par la modulation de la voie cholinergique anti-inflammatoire. **VGX** : vagotomie.

## 2.4 L'électrostimulation vagale

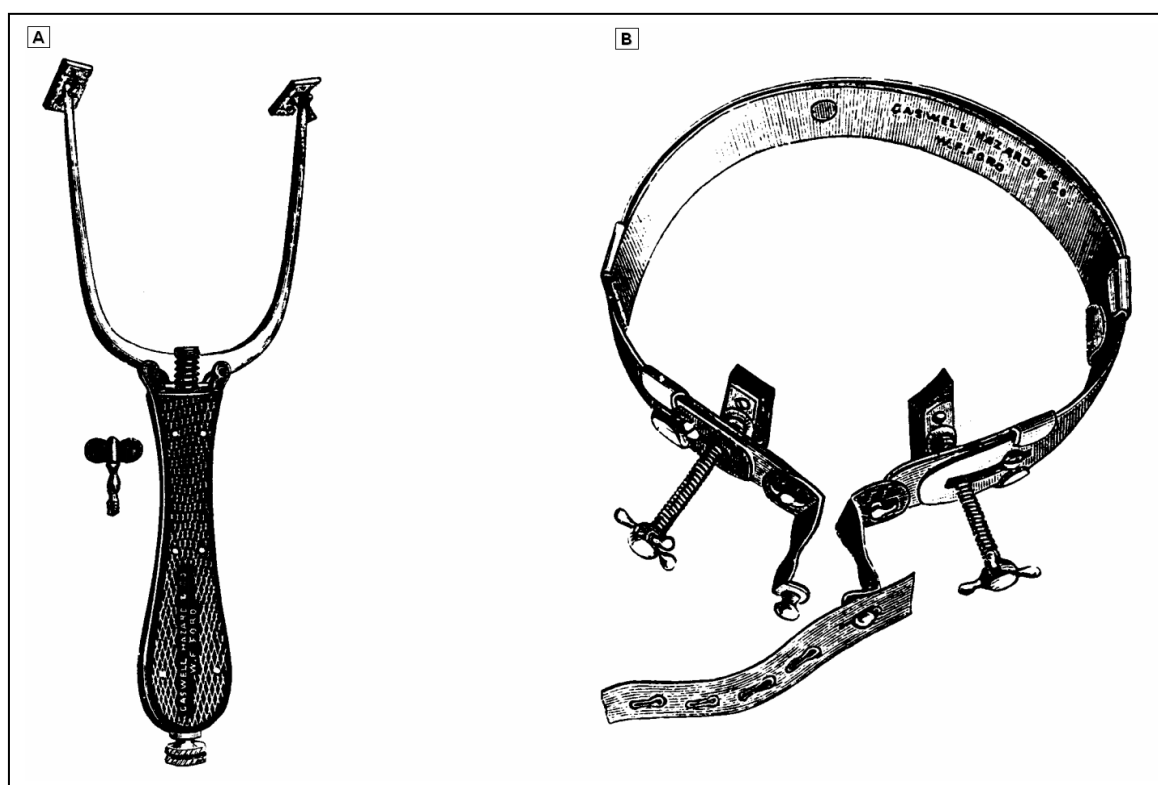
### 2.4.1 Historique de l'électrostimulation vagale

Le premier à avoir envisagé la VNS fut le Dr James Léonard Corning (figure 12) qui, dans les années 1880, avait imaginé un système de stimulation électrique externe du nerf vague afin de stopper les crises d'épilepsie (travaux décrits par Lanska, 2002).



**Figure 12** : le Dr James Leonard Corning (1855-1923) (Lanska, 2002).

Son hypothèse initiale était que, grâce à une réduction du flux sanguin irrigant le cerveau, il parviendrait à stopper les crises d'épilepsie. A l'époque, en effet, une idée répandue attribuait les crises d'épilepsie à un flux sanguin excessif à destination du SNC. C'est pourquoi, après avoir imaginé des dispositifs de compression des carotides (« carotid fork » et « carotid truss ») (figure 13), il mit au point un dispositif pour réaliser en plus des stimulations électriques transcutanées du nerf vague afin de moduler l'activité cardiaque et ainsi réduire le flux sanguin à destination du cerveau (« electrocompressor ») (figure 14). Bien que le Dr Corning ait rapporté des effets bénéfiques suite à son traitement, le dispositif ne fut pas accepté par ses collègues et son idée, comme ses instruments, tombèrent dans l'oubli pendant plusieurs décennies.

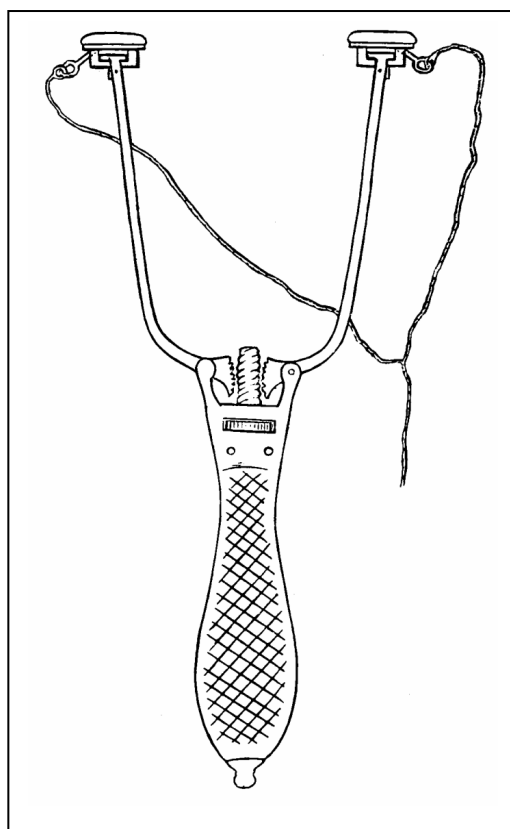


**Figure 13** : dispositifs de compression des carotides du Dr Corning (Lanska, 2002).

**A** : « carotid fork » ; **B** : « carotid truss » (Lanska, 2002).

C'est en 1938 que le concept de VNS fit son retour avec Bailey et Bremer (Bailey & Bremer, 1938) qui reconnurent le potentiel de cette technique en raison de ses effets sur le SNC. Après plusieurs études expérimentales réalisées chez diverses espèces animales, c'est en 1988, soit pratiquement un siècle après Corning, que le premier dispositif de VNS

fut implanté chez l'Homme (Groves & Brown, 2005). La VNS fut ensuite approuvée comme traitement de l'épilepsie dès 1994 en Europe, et comme traitement des dépressions chronique ou récurrente en 2001 (Groves & Brown, 2005). Le mécanisme exact produit au niveau du cerveau n'est pas encore complètement connu, il est toutefois intéressant de souligner que les effets thérapeutiques obtenus ne résultent pas d'une stimulation des efférences vagales, comme l'avait imaginé initialement le Dr Corning, mais bien d'une stimulation des afférences.



**Figure 14** : dispositif de stimulation électrique transcutanée du nerf vague du Dr Corning (Lanska, 2002).

#### 2.4.2 *L'électrostimulation vagale aujourd'hui*

De nos jours, l'unique neurostimulateur utilisé chez l'Homme est produit par la société Cyberonics. Il permet de délivrer des stimuli intermittents dont la fréquence, l'intensité et la durée sont programmables. Plusieurs études pilotes ont permis à la société Cyberonics d'obtenir l'accord des agences de santé européennes et américaine pour la commercialisation de la stimulation vagale comme thérapie des épilepsies réfractaires en

1994 pour l'Europe et en 1997 pour les Etats-Unis. Aujourd'hui, plus de 50.000 patients ont déjà bénéficié de ce traitement dans le monde. Les résultats des études de suivi de ces patients montrent que l'effet thérapeutique de la stimulation vagale s'accroît avec le temps, et qu'environ 30% d'entre eux voient la fréquence de leurs crises d'épilepsie diminuer de plus de 50% après au minimum six mois de traitement (Boon *et al.*, 2009).

En ce qui concerne l'application de la VNS aux dépressions pharmaco-résistantes, ce traitement a été autorisé par l'agence de santé européenne en 2001 et en 2005 aux Etats-Unis. Selon de récentes études, 37% des patients traités ont une amélioration et 17% seraient en rémission totale après 3 mois de traitement. Dans ce cas encore, la VNS voit ses effets thérapeutiques augmenter avec le temps puisque après un an de traitement, ces taux passent à 53% de patients avec amélioration et à 33% de rémission (Schlaepfer *et al.*, 2008).

Dans ces deux indications, la stimulation du nerf vague gauche, au niveau cervical n'a aucun retentissement sur la fréquence cardiaque (qui dépend majoritairement du nerf vague droit innervant le nœud sino-atrial). Les fréquences de stimulation permettant d'obtenir les effets thérapeutiques sur le SNC sont de l'ordre de 20 à 30 Hz. La relative absence d'effets périphériques induits par ces paramètres de stimulation et ce type d'implantation suggèrent que les fibres stimulées sont majoritairement les afférences vagales. Malgré des études mécanistiques, réalisées chez l'Homme comme chez l'animal, les mécanismes exacts mis en jeu au niveau du SNC ne sont pas encore connus avec certitude. Des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou par électro-encéphalographie (EEG) ont pu déterminer que des changements sont induits dans les deux hémisphères cérébraux par la VNS et ce, en dépit de la stimulation unilatérale (Henry *et al.*, 1998; Van Laere *et al.*, 2002). Cet effet semble obtenu par le recrutement des fibres afférentes A et B du nerf vague (Zagon & Kemeny, 2000; Evans *et al.*, 2004). La VNS semble restaurer la synchronisation neuronale et plusieurs structures cruciales ont été identifiées comme le locus cœruleus, le thalamus, le NTS, ainsi que des structures limbiques (Naritoku *et al.*, 1995; Krahel *et al.*, 1998; Osharina *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2008).

Dans le cas de l'épilepsie et de la dépression, la VNS est une thérapie reconnue et appliquée chez l'Homme. Cependant, d'autres études expérimentales ou cliniques visent à étudier le potentiel thérapeutique de la VNS sur d'autres pathologies, notamment : la

migraine, l'anxiété, la maladie d'Alzheimer (Sjogren *et al.*, 2002; Groves & Brown, 2005), l'obésité (Laskiewicz *et al.*, 2003; Sobocki *et al.*, 2005; Bugajski *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2007).

## 3 *Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin*

### 3.1 **Généralités sur l'inflammation**

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression (Roitt *et al.*, 2002). Le but de ce phénomène est de résister à l'agression, notamment par des pathogènes, grâce aux phénomènes d'immunité. Il existe une immunité innée (ou naturelle), qui ne dépend pas d'une exposition préalable aux pathogènes, et une immunité spécifique (ou adaptative), qui est mise en jeu lors d'une deuxième exposition à un pathogène donné.

L'inflammation peut avoir des causes physiques (chaud, froid ou encore radiations ionisantes), chimiques (composés acides ou basiques, ou toxines bactériennes), ou être la conséquence d'une infection (présence d'un organisme pathogène comme une bactérie, un virus, un champignon, ou un parasite). Enfin, l'inflammation peut être la conséquence d'une nécrose tissulaire (suite à une ischémie/reperfusion par exemple).

Plusieurs types cellulaires sont à l'origine de l'immunité de l'organisme :

- les lymphocytes,
- les cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques),
- les mastocytes et polynucléaires basophiles,
- les fibroblastes.

#### 3.1.1 *Les lymphocytes*

Ces cellules sont responsables de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire.

Il existe plusieurs types de lymphocytes :

- type B producteurs d'anticorps,
- type T : auxiliaires (ou encore « helpers » (Th) exprimant les marqueurs CD4+, ou cytotoxiques (CD8+),

- type NK (Natural killer) pouvant eux aussi avoir une activité cytotoxique.

Dans le cas d'une réponse inflammatoire activée par les cellules sentinelles, ce sont essentiellement les lymphocytes Th qui vont être impliqués. Parmi les Lymphocytes Th, il existe les effecteurs et les régulateurs (Treg). Les lymphocytes effecteurs sont divisés en sous classes (Th1, Th2 et Th17) selon les cytokines qu'ils produisent.

Les Th1 produisent l'IL-8, l'interféron- $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , les Th17 plus récemment découverts sécrètent pour leur part l'IL-17. Ces deux types lymphocytaires vont provoquer une réponse immunitaire à médiation plutôt cellulaire.

Les Th2, quant à eux, sécrètent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, qui vont surtout provoquer une réponse immunitaire à médiation humorale.

Au sein des lymphocytes régulateurs, les Treg1 sont importants dans le cas des MICI puisqu'ils produisent le TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), impliqué dans les mécanismes de réparation tissulaire et l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire très importante afin d'éviter la réponse inflammatoire excessive. Cette action est exercée en limitant l'activation des lymphocytes effecteurs.

Des modifications au niveau de la balance Th1/Th2 ont été décrites au cours de l'inflammation et dans le cas des colites (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

### 3.1.2 Les cellules phagocytaires

Ces cellules comprennent les polynucléaires neutrophiles et les cellules du système monocyte/macrophage. Ces cellules sont responsables de la phagocytose, phénomène réalisé en plusieurs étapes :

- l'adhérence entre la cellule phagocytaire et la particule à phagocyter. Elle est permise grâce à plusieurs molécules d'interactions comme les molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM),
- la particule à phagocyter est ensuite englobée par le phagosome,
- enfin, une digestion de la particule est réalisée par fusion du phagosome avec le lysosome riche en enzymes protéolytiques.

### 3.1.3 Les médiateurs chimiques

Le déclenchement et le maintien de l'inflammation, ainsi que sa diffusion au niveau du foyer initial font appel à des facteurs synthétisés localement ou à l'état inactif au niveau systémique.

Les médiateurs chimiques locaux sont :

- les amines (histamines et sérotonine) : libérées par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Elles provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire,
- les prostaglandines et leucotriènes : à l'origine de la vasodilatation, de la douleur et de l'attraction locale des polynucléaires et de la fièvre,
- les molécules d'adhérences : permettent le ciblage du foyer inflammatoire par les cellules immunitaires. Elles sont exprimées par les vaisseaux du foyer inflammatoire et retiennent les cellules sanguines comportant le ligand correspondant,
- les cytokines : elles sont produites par de nombreuses cellules comme les lymphocytes T et les macrophages. Elles agissent sur des récepteurs membranaires de manière autocrine (de la cellule productrice), paracrine (cellule proche) ou endocrine (cellule à distance). Elles peuvent être pro-inflammatoires (interleukine (IL) : IL-1 $\beta$ , IL-6, ou le TNF $\alpha$ ) ou encore anti-inflammatoires (IL-10). Les cytokines sont responsables de la médiation de l'immunité innée, de la régulation de l'activation, de la croissance et de la différenciation des lymphocytes, ainsi que de la stimulation de l'hématopoïèse.

Les médiateurs circulants ne sont pour leur part activés qu'à la suite de cascades de réactions permettant de réguler leur production. Parmi ces médiateurs il y a :

- le système des kinines, qui provoque la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et est un médiateur de la douleur (bradykinines),
- le système du complément, regroupant des protéines sériques activées lors de l'interaction antigène-anticorps. Il permet, entre autre, la dégranulation des mastocytes et des polynucléaires basophiles et la phagocytose des bactéries,

- le système coagulation/fibrinolyse : permet la formation du caillot afin de limiter le foyer inflammatoire et constitue une matrice sur laquelle les cellules immunitaires peuvent se déplacer.

### **3.2 Généralités sur les MICI**

La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) impliquant l'intestin grêle, le côlon et le rectum. Les MICI se caractérisent par une réponse disproportionnée du système immunitaire face à des éléments naturels. En effet, le tube digestif étant l'interface entre les agents extérieurs et le milieu intérieur, le système immunitaire y est très présent puisqu'il se doit de s'activer et de prévenir une infection potentielle. Pour cela, les cellules sentinelles du système immunitaire (cellules dendritiques et macrophages) vont reconnaître les éventuels agresseurs et exprimer des cytokines afin d'activer les cellules effectrices (notamment les lymphocytes) précises pour adapter la réponse immunitaire. En temps normal, la réponse inflammatoire est modérée lorsqu'il s'agit d'un agent bénéfique (cas de la flore endogène) et il y a apparition d'une tolérance entre l'organisme et l'agent extérieur. Lorsque des agents pathogènes, viraux ou bactériens, sont détectés, ceux-ci vont non seulement être éliminés, mais il va aussi se produire une mémorisation de l'agresseur par le système immunitaire ce qui permettra, lors d'une seconde rencontre, une réaction immunitaire plus adaptée et plus rapide.

Dans le cas des MICI, le système immunitaire va être activé, entre autre, par les bactéries habituelles se trouvant dans la flore intestinale et non pathogènes en temps normal, il y a une perte de la tolérance immunitaire. Il va en résulter une inflammation et une attaque de la muqueuse intestinale, le système immunitaire, protecteur en temps normal se révèle être très nocif en l'absence d'agresseur. Cette hyper-activation du système immunitaire résulte d'un déséquilibre dans la balance effecteur/régulateur avec un excès de cellules effectrices. Dans le cas de la MC, la réponse immunitaire présente un excès de Th1-Th17, alors qu'il s'agit d'un excès de Th2 dans le cas de la RCH (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008).

Ces deux pathologies restent aujourd'hui encore méconnues et peu évoquées en raison de leurs symptômes (diarrhées notamment) mais aussi très invalidantes (douleurs

abdominales, perte de poids, fièvre...), notamment dans le cas des formes les plus graves (35% des cas). Toutes deux évoluent par période de poussées inflammatoires entrecoupées de périodes de rémissions plus ou moins longues selon les patients.

### **3.3 Prévalence**

Il est estimé qu'environ 200.000 personnes sont atteintes de MICI en France : 120.000 par la MC et 80.000 par la RCH. Entre 5.000 et 6.000 nouveaux cas sont observés chaque année en France, et plus généralement, depuis une cinquantaine d'années les MICI sont en augmentation, notamment dans les pays industrialisés où le nombre de cas a été multiplié jusqu'à 10 fois. Ceci est en faveur d'une influence environnementale et sociétale (Koutroubakis *et al.*, 1996), observation renforcée par la très forte progression des MICI dans des pays nouvellement industrialisés comme la Chine (Pang *et al.*, 2007).

Outre le facteur environnemental, le facteur génétique est lui aussi très important dans le déclenchement des MICI. Le gène NOD2/CARD15 a en effet été identifié comme gène de susceptibilité (Van Limbergen *et al.*, 2009; Yazdanyar & Nordestgaard, 2009). La fonction exacte de ce gène n'est pas encore clairement élucidé, il semble coder pour une protéine intervenant dans la reconnaissance cytoplasmique de certaines bactéries (muramyl dipeptide), mais ne semble pas intervenir dans l'activation de la voie NFκB comme l'avançaient les premières hypothèses (Pauleau & Murray, 2003). Ce gène est relativement ubiquitaire, puisqu'il est exprimé non seulement par des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques) mais aussi dans les cellules épithéliales et les cellules de Paneth (Gutierrez *et al.*, 2002; Berrebi *et al.*, 2003; Lala *et al.*, 2003). Actuellement, il a été montré que trois principales mutations de ce gène permettent de distinguer des groupes de patients dont le risque d'être atteint d'une MC est accru de 40%. Toutefois, il est important de noter que le facteur génétique ne suffit pas à lui seul à décrire l'apparition des MICI, puisque seul un patient sur cinq est atteint de la forme dite familiale de la MC. L'étiopathogénie des MICI est complexe et multifactorielle impliquant des facteurs environnementaux, génétiques et infectieux.

Outre les complications associées aux MICI (sténoses, fistules, abcès, occlusions), ces pathologies induisent aussi l'activation de cellules infiltrantes (comme les leucocytes) qui vont libérer des médiateurs responsables de dommages à l'ADN et modifier les signaux de croissances cellulaires, deux processus associés à une mauvaise restructuration de

l'épithélium et donc au développement de cancers. La RCH et la MC comportent donc un risque augmenté de cancers colorectaux (CCR), d'adénocarcinomes du grêle (pour la MC uniquement) et de cancers extra-intestinaux (cholangiocarcinome, lymphomes non-hodgkiniens), risque qui s'ajoute aux effets secondaires carcinogènes des traitements médicamenteux des MICI. Les malades atteints de MICI ont, par rapport à la population générale, un risque 5 fois supérieur de développer un CCR. Ce risque est modulé par la durée de l'évolution de la maladie et l'étendue de l'atteinte colique. Ainsi, dans la rectocolite, le risque de cancer est d'environ 2% après 10 ans d'évolution, 8% après 20 ans et environ 18% après 30 ans d'évolution (Eaden *et al.*, 2001). Notons ici que les MICI sont la plupart du temps détectées chez le sujet jeune (moyenne d'âge : 20 ans) et que ces facteurs de risques de CCR nécessiteront une surveillance au long cours (endoscopies) de ces patients à risque.

### **3.4 Atteintes anatomiques**

Le diagnostic des MICI est essentiellement basé sur les observations endoscopiques et sur l'examen anatomopathologique des biopsies du colon et/ou de l'iléon. La MC et la RCH diffèrent par leur localisation et par leur type de lésion.

La RCH touche uniquement le côlon et le rectum (Farahat *et al.*, 1999). Les lésions qu'elle engendre sont superficielles (atteinte de la muqueuse et de la sous-muqueuse) et surtout hémorragiques.

La MC peut quant à elle toucher l'ensemble du système digestif (de la bouche jusqu'à l'anus). Les lésions provoquées par la MC sont beaucoup plus profondes et sont dites transpariétales puisque l'ensemble des différentes couches composant le système digestif peuvent être atteintes.

Ces deux pathologies peuvent s'accompagner de troubles extra-intestinaux comme des rhumatismes, des troubles oculaires, ou des atteintes dermatologiques.

### **3.5 Les Traitements**

#### **3.5.1 Traitements pharmacologiques**

Il existe deux types de stratégies thérapeutiques distinctes :

- i) le traitement des poussées dont le but est de réduire leur durée et les symptômes,

ii) le traitement d'entretien dont le but est de maintenir la phase de rémission et prévenir la récurrence de poussées. Il y a actuellement 4 principales familles de substances pharmacologiques couramment utilisées dans le traitement des MICI :

- les 5-aminosalicylés ou 5-ASA : il s'agit du traitement de base de la RCH en raison de son efficacité (dans 60 à 70% des cas de RCH), de sa bonne tolérance, et de son faible nombre d'effets secondaires (nausées, diarrhées). L'action bénéfique des 5-ASA serait induite par plusieurs inhibitions : de la production de prostaglandines et des leucotriènes, du chimiotactisme des neutrophiles et de l'activation du NFκB ; ainsi que de la capture des radicaux libres de l'oxygène. Cependant, ce traitement n'a que peu d'efficacité dans le cas de la MC.
- les corticoïdes : ils sont prescrits en deuxième intention, notamment dans le cas d'inefficacité ou en période de poussée sévère. Leur efficacité est accrue tout comme leurs effets secondaires (fièvre, hépatite, pancréatite aiguë, et très rarement lymphome cérébral). Ce sont des anti-inflammatoires stéroïdiens qui agissent sur la synthèse de certains médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, histamines et prostaglandines) par l'intermédiaire d'une inhibition de la production de l'acide arachidonique.
- les immunosuppresseurs (azathioprine, 6-mercaptopurine ou méthotrexate) : peuvent être utilisés dans le traitement d'entretien, ils ne sont actifs qu'après plusieurs semaines de traitement. Leur mécanisme d'action n'est pas vraiment identifié, mais il pourrait provenir d'un effet anti-apoptotique et de l'inhibition de la différenciation de certaines populations lymphocytaires.
- les biothérapies ciblées sur les anti-TNFα concernent 10% des patients. Ces anticorps sont synthétiques (chimérique pour l'Infliximab® : 75% humain et 25 % murin ; ou 100% humain pour l'Adalimumab®). Ces substances thérapeutiques sont très utilisées en cas d'échecs thérapeutiques avec les traitements énumérés précédemment ou face aux formes sévères. Elles comportent certains risques (allergie, tuberculose, pneumonie, insuffisance cardiaque, hépatite, maladies neurologiques démyélinisantes, lymphome). Ce sont les seuls traitements à reposer sur les connaissances acquises avec les études sur la MC (Andreaskos *et al.*, 2002; Probert *et al.*, 2003).

### 3.5.2 Traitements Chirurgicaux

La chirurgie est réservée aux formes réfractaires aux traitements pharmacologiques et pour les sujets ayant des complications de la maladie (cancer notamment). La chirurgie chez les patients atteints de la MC est pratiquée dans des cas comportant de gros risques de fistules et de sténose. Elle est alors limitée aux zones les plus sévèrement touchées, 90% des patients atteints de MC sont opérés au moins une fois afin de retirer la partie la plus atteinte du système digestif. Le taux de récurrence dans l'année suivant la chirurgie est de 80%. Pour ces raisons, la chirurgie reste une technique permettant un soulagement rapide mais elle n'empêche absolument pas les fréquentes récurrences de la MC. La chirurgie pratiquée est donc la plus épargnante possible.

Dans le cas de la RCH, la chirurgie est réalisée dans les formes suraiguës comportant des évolutions chroniques mal contrôlées ou des formes anciennes avec un risque aggravé d'évoluer vers des formes de dégénérescence maligne. La colectomie totale peut dans certains cas de RCH être totalement curative, mais elle engendre d'importants inconvénients comme les selles multiples et liquides ainsi que le risque d'incontinence fécale. Dans le cas de colectomie totale, les chirurgiens réalisent des anastomoses soit iléo-rectales soit iléo-anales, avec des risques de complications comme la pochite (Bach & Mortensen, 2007).

## 3.6 Modèles expérimentaux de colites

Il existe plusieurs méthodes pour induire artificiellement une inflammation au niveau du côlon chez des espèces animales couramment utilisées en laboratoire. Ces différents modèles sont utilisés pour l'étude de nouveaux agents thérapeutiques potentiellement utilisables dans le traitement des MICI.

L'inflammation peut être provoquée par exposition de l'animal à divers agents physiques ou chimiques (Strober *et al.*, 2002). La colite peut aussi être induite chez des animaux transgéniques (KO) notamment par invalidation de gènes impliqués dans l'expression de certaines cytokines (IL-10) ou de certaines protéines des voies de signalisation de l'inflammation (Strober *et al.*, 2002).

En raison du grand nombre de modèles de colite disponibles, ne sont détaillés ici que les modèles utilisés dans le laboratoire. Dans les deux cas, la colite est induite par des

agents chimiques dénaturants qui sont introduits par ingestion ou instillation au contact de la muqueuse intestinale. Il s'agit du modèle au dextran sulfate sodium (DSS) et du modèle à l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS).

Le modèle de colite au DSS est obtenu par ajout de cet agent dans l'eau de boisson de l'animal. L'inflammation intestinale est obtenue après plusieurs périodes d'exposition au DSS entrecoupées de périodes de repos (Okayasu *et al.*, 1990). L'inflammation induite est donc chronique puisque chacune des périodes dure plusieurs jours. Elle touche l'ensemble du tube digestif. Sur le plan tissulaire, celle-ci a des propriétés proches de la RCH, avec une inflammation s'étendant au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse et des hémorragies.

Le modèle de colite au TNBS est quant à lui obtenu par instillation intracolique de TNBS. Ce modèle a été décrit par Morris (Morris *et al.*, 1989). L'agent chimique est injecté dans le côlon en présence d'éthanol afin de faciliter sa diffusion intra-tissulaire. Le TNBS est un haptène qui va induire une modification des protéines de l'hôte et provoquer une attaque par le système immunitaire des tissus digestif. Il s'agit d'un modèle d'inflammation aiguë qui présente un grand nombre de similitudes avec la maladie de Crohn, notamment des lésions très intenses et transpariétales (Morris *et al.*, 1989; Miceli & Jacobson, 2003).

# **Objectif de l'étude**

## Objectif de l'étude

Le but de notre étude a été d'utiliser les propriétés anti-inflammatoires du nerf vague, en particulier de ses efférences, pour améliorer ou prévenir les effets inflammatoires d'un modèle de colite expérimentale au TNBS chez le rat. Pour cela, les paramètres de stimulation ont été modifiés par rapport à ceux utilisés dans le traitement de l'épilepsie et de la dépression, en l'occurrence nous avons réalisé des stimulations à « basse fréquence » (5 Hz), fréquence supposée stimuler les efférences vagales et la voie cholinergique anti-inflammatoire (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a).

Les voies neuro-digestives, en particulier celles empruntant le nerf vague, interviennent au premier plan dans la réponse anti-inflammatoire de l'organisme à une agression périphérique. Elles interviennent donc dans la physiopathologie des MICI. La voie cholinergique anti-inflammatoire, apparaît comme une cible thérapeutique potentielle. Une stimulation électrophysiologique des fibres vagales apparaît particulièrement intéressante et représenterait une avancée nouvelle et originale dans le traitement des MICI. Par comparaison au traitement à propriété anti-TNF $\alpha$  (Rémicade®, Adalimumab®), utilisé actuellement dans le domaine des MICI, la VNS aurait l'avantage de son coût (environ 10.000 € pour le matériel de stimulation et 12.500 € pour l'implantation soit au total 22.500€ pour plusieurs années, alors que le traitement au Rémicade® coûte 27.000 € pour seulement un an de traitement), de sa bonne tolérance voire et de son innocuité. De plus, ce type de dispositif de neurostimulation chronique, tel qu'il est utilisé dans l'épilepsie et la dépression, préviendrait les problèmes d'observance thérapeutique (non respect des prescriptions) rencontrés chez 40% des patients dans le domaine des MICI (Cervený *et al.*, 2007).

Aucune donnée sur la VNS n'est actuellement disponible dans le domaine de la pathologie inflammatoire digestive, qu'elle soit de nature expérimentale ou clinique. Des données uniquement pharmacologiques, ont été publiées dans un modèle expérimental de pancréatite (van Westerloo *et al.*, 2006) et dans un modèle d'inflammation péritonéale de l'iléus post-opératoire (The *et al.*, 2007). D'autre part, les effets d'agonistes cholinergiques ainsi que des anti-ChE ont été testés avec succès dans un modèle expérimental de colite (Miceli & Jacobson, 2003). La voie cholinergique anti-inflammatoire a donc un intérêt

potentiel dans le domaine de la gastroentérologie et particulièrement pour le traitement des MICI (Bonaz, 2007).

Le but de ce travail a été d'étudier les effets engendrés par la VNS sur un modèle de colite au TNBS. Pour cela, nous avons :

- 1) réalisé une stimulation répétée du nerf vague chez des rats vigiles avec une électrode de stimulation chroniquement implantée et des paramètres décrits comme activateurs de la voie cholinergique anti-inflammatoire,
- 2) étudié les effets de la VNS aux niveaux moléculaire, tissulaire, et intégré,
- 3) examiné les mécanismes d'action de la VNS dans notre modèle, notamment ses effets sur les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu dans l'activation des cellules immunitaires,
- 4) étudié les effets latéraux de la VNS sur le SNC et la motricité digestive.

La finalité de ce projet est de proposer à terme, chez l'Homme, la VNS dans le traitement de la poussée ou dans le traitement d'entretien des MICI. Ce type de thérapie, utiliserait les propriétés anti-inflammatoires de la voie cholinergique sans avoir les inconvénients des thérapies biologiques (effets secondaires, coût, observance).

# **1<sup>ère</sup> Partie : Application de l'effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale à un modèle de colite**

# Application de l'effet anti-inflammatoire de l'électrostimulation vagale à un modèle de colite

## 1 *Matériels et méthodes*

La première partie des travaux réalisés a consisté à mettre au point l'électrostimulation vagale ainsi que son application à l'inflammation induite par un modèle de colite expérimentale chez le rat.

La mise au point de la chirurgie d'implantation a d'abord fait l'objet d'essais sur des rats anesthésiés. Grâce à de premières implantations « aiguës », nous avons pu parfaire la technique chirurgicale d'implantation de l'électrode. Une seconde étude préliminaire nous a aussi permis d'adapter le modèle de colite au TNBS.

### 1.1 Animaux

L'expérimentation a été réalisée sur des rats mâles Spragues-Dawley de 250-300g (Janvier, Le Genest St Isle, France). Ils ont été hébergés dans des conditions de stabulation contrôlées :

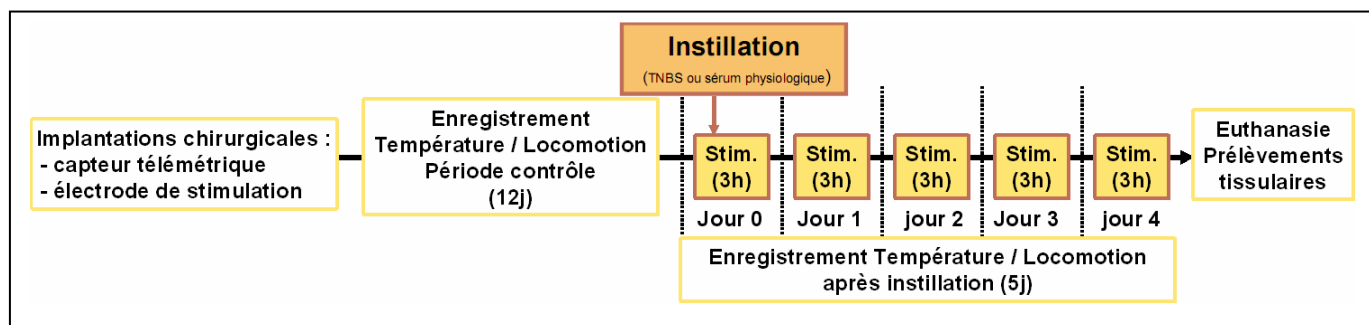
- température :  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,
- hygrométrie :  $50 \pm 10\%$ ,
- cycle nycthéral : 12h/12h, lumière de 8h à 20h, obscurité de 20h à 8h,
- litière (copeaux de bois), changée 3 fois par semaine,
- nourriture et eau *ad libitum*.

Les animaux ont été acclimatés pendant au minimum 7 jours avant toute manipulation. L'ensemble des expériences a été effectué pendant des créneaux horaires identiques (9h-12h ou 13h-14h selon les étapes du protocole) afin de limiter les variations circadiennes.

Le choix de l'espèce animale a été fait en fonction des implications liées aux impératifs de la technique de VNS. En effet, la plupart des études de VNS ont été réalisées chez cette espèce pour des raisons techniques de localisation et d'isolement du nerf vague (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002b; Guarini *et al.*, 2003). De plus, de nombreuses études concernant la colite ont été mises au point sur le rat (Morris *et al.*,

1989). Enfin il s'agit de l'espèce animale couramment utilisée dans notre laboratoire (Porcher *et al.*, 2004; Sinniger *et al.*, 2004; Porcher *et al.*, 2005).

Le déroulement des différentes étapes de l'expérimentation animale est illustré par le chronogramme présenté dans la figure 15.

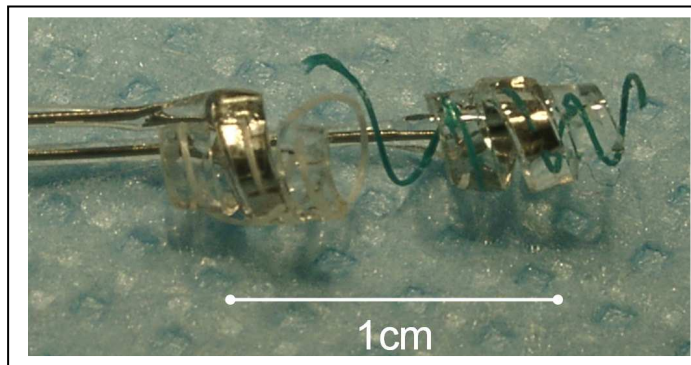


**Figure 15** : chronogramme de l'expérimentation animale.

## 1.2 Chirurgie

La chirurgie d'implantation a été effectuée sur des rats anesthésiés par injection intramusculaire (IM) d'un mélange de kétamine (Imalgene 1000®, Merial, Lyon, France) et d'acépromazine (Calmivet®, Vétquinol, Lure, France) 125mg/kg et 0,15mg/kg respectivement. Les animaux ont ensuite été rasés au niveau de l'abdomen, du triangle cervico-scapulaire ventral et au niveau du crâne.

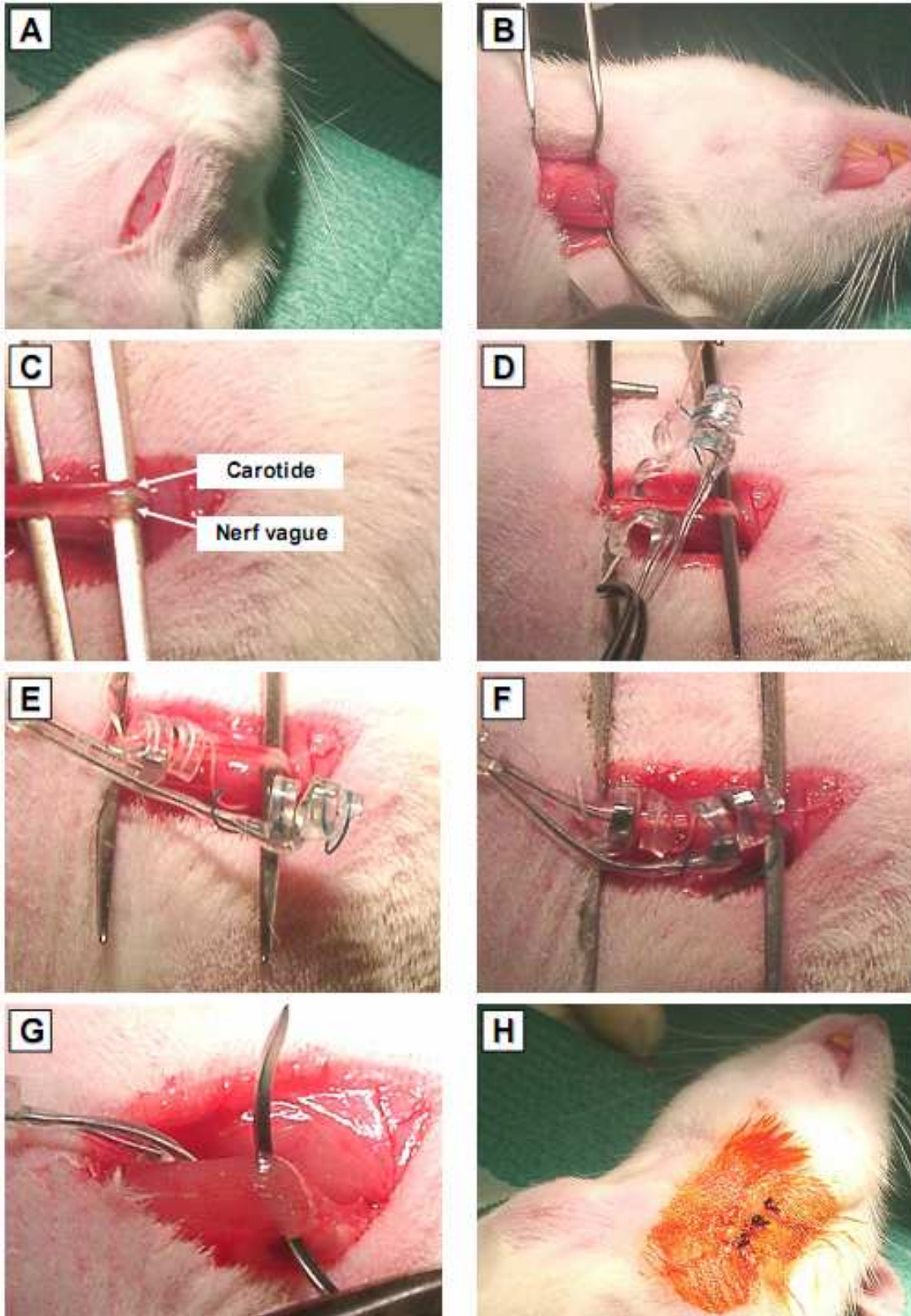
La première partie de la chirurgie a été consacrée à l'implantation intra-abdominale du capteur de télémétrie (Physiotel TA10TAF40, Data Sciences International, MN, US). Celui-ci a été stérilisé une immersion de 10 min dans l'Endosporine® (Laboratoires Hydenet Stéridine, Sainghin-en-Mélantois, France) puis rincé au sérum physiologique. L'abdomen du rat a été incisé, d'abord au niveau cutané, puis au niveau de la ligne médiane, entre les faisceaux des muscles droits. Le capteur de télémétrie a été introduit à l'intérieur de la cavité abdominale du rat. Après l'introduction du capteur, deux sutures ont été réalisées, une au niveau du plan musculaire (Soie F736, Ethicon, Neuchâtel, Switzerland) et une au niveau cutané (Vicryl JV452, Ethicon).



**Figure 16** : électrode animale de stimulation (Cyberonics) : électrode bipolaire spiralée, de diamètre interne : 1mm.

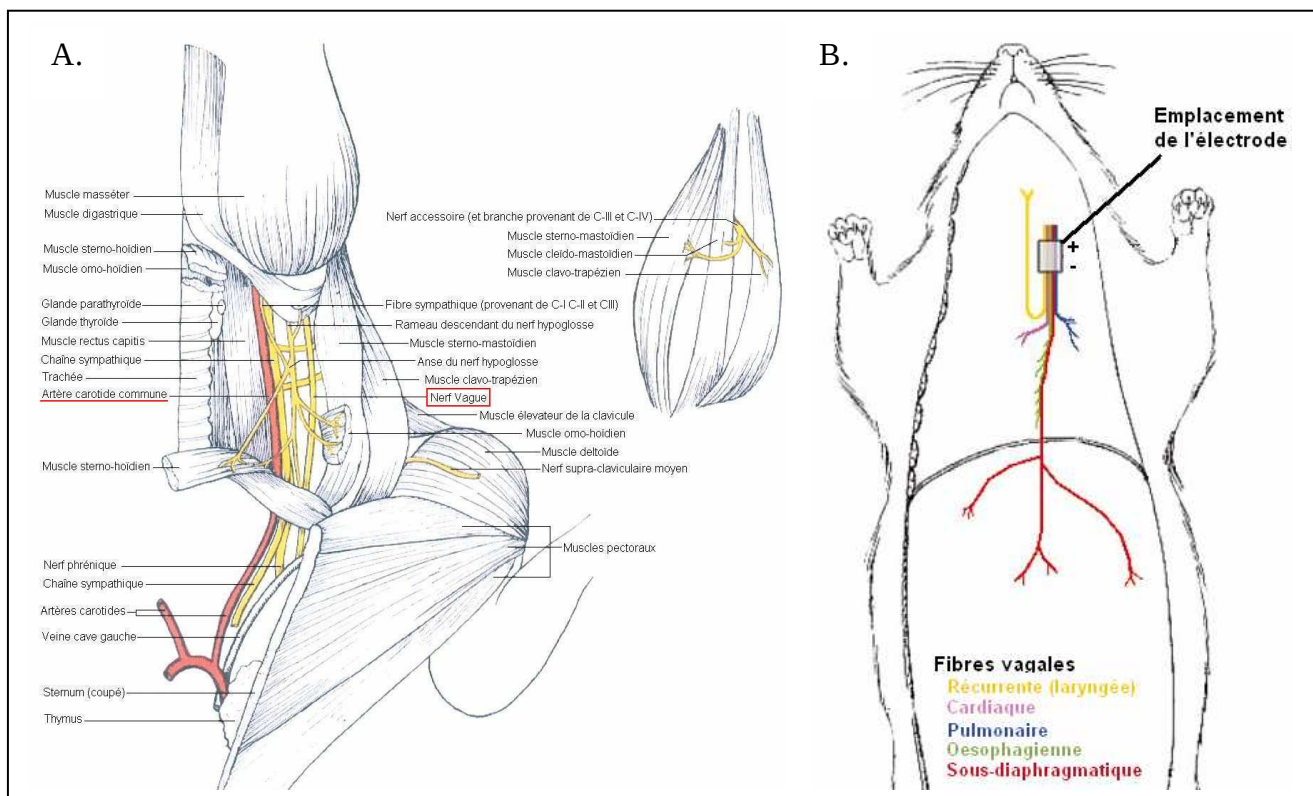
La seconde partie de la chirurgie a consisté en l'implantation de l'électrode de stimulation vagale (Figure 16) (électrode animale, Cyberonics, Lyon, France). Celle-ci a été stérilisée selon le même protocole que le capteur de télémétrie. Une incision de la peau au niveau cervical ventral a été réalisée (figure 17A) pour permettre l'abord et la dilacération dans le sens des fibres du muscle sterno-cléido-mastoïdien afin de dégager la carotide gauche (figure 17B et C). Après isolement du paquet vasculo-nerveux, le nerf vague a été repéré puis l'électrode bipolaire spiralée placée autour de l'ensemble vasculo-nerveux (figure 17D, E et F) (anode/proximale et cathode/distale) selon une méthodologie validée (figure 18) (Handforth & Krah, 2001; Krah *et al.*, 2004; Follesa *et al.*, 2007). Le plan musculaire a été refermé et l'électrode fixée à la surface du muscle par un point de suture (F736, Ethicon) (figure 17G). Une incision médiane a ensuite été effectuée sur le dessus du crâne, et une tunnelisation sous-cutané a été réalisée pour amener les fils de connexion de l'électrode jusqu'à la partie postérieure du crâne avant la fermeture du plan cutané cervical (JV452, Ethicon) (figure 17H).

Le rat a ensuite été installé sur le cadre de stéréotaxie (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) afin de mettre en place le connecteur (barrette CI2x6, Selectronic, Lille, France) reliant l'électrode à la chaîne de stimulation. Après résection des plans cutanés et dégagement de la surface osseuse, une hémostase soignée a été réalisée et quatre vis d'ancrage (diamètre : 1mm), ont été fixées sur le crâne du rat. L'électrode a ensuite été soudée au connecteur puis celui-ci a été fixé au crâne grâce à du ciment dentaire (Dentalon®, Heraeus, Courtaboeuf, France).



**Figure 17** : implantation chirurgicale de l'électrode de stimulation.

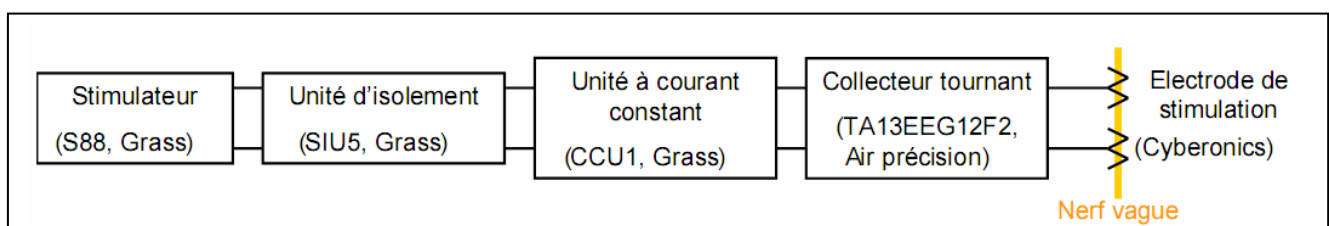
**A** : incision du plan cutané ; **B** : dilacération du muscle sterno-cléido-mastoïdien ;  
**C** : isolation de la carotide et du nerf vague ; **D, E, F** : mise en place des 2 pôles de l'électrode autour de la carotide et du nerf vague ; **G** : suture et fixation de l'électrode sur le plan musculaire ; **H** : suture du plan cutané.



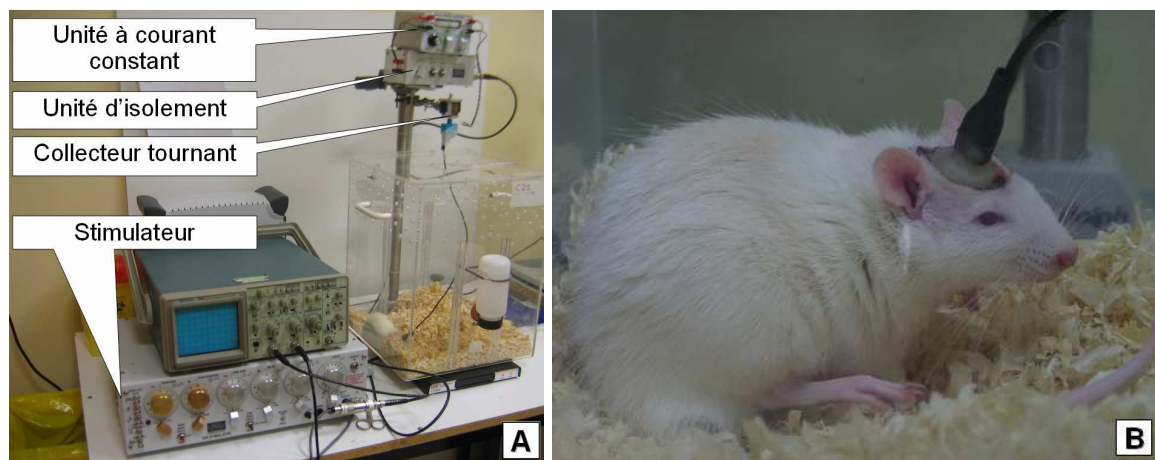
**Figure 18** : schéma de l'implantation de l'électrode de stimulation.

**A** : anatomie vagale au niveau cervical ; **B** : emplacement de l'électrode de stimulation par rapport aux différentes fibres vagues chez le rat (d'après Krahl *et al.*, 2004).

Après deux jours de récupération, les rats ont ensuite été légèrement anesthésiés par injection IM d'un mélange de kétamine (50mg/kg) et d'acépromazine (0,05mg/kg) puis reliés au dispositif de stimulation (unité d'isolement, SIU5 ; unité à courant constant, CCU1 ; stimulateur, S88 ; Grass Technologies, Astro-Med, RI, USA) par l'intermédiaire d'un câble relié à un collecteur tournant (TA13EEG12F2, Air Précision, Le Plessis Robinson, France) (figure 19). Le rat était donc vigile, libre de tout mouvement, et relié jusqu'à la fin de l'expérience à la chaîne de stimulation (figure 20). Douze jours de récupération ont été laissés au rat avant le début de la VNS et l'instillation du TNBS.



**Figure 19** : schéma de la chaîne de stimulation.



**Figure 20** : rat vigile relié au dispositif de stimulation

**A** :dispositif de stimulation ; **B** : un rat vigile avec électrode implantée.

### 1.3 Groupes d'animaux

Quatre groupes de 12 animaux ont été utilisés pour cette expérimentation :

- le groupe contrôle (Sham/Salin) : pas de stimulation, instillation intracolique de sérum physiologique,
- le groupe VNS/Salin : stimulation vagale et instillation intracolique de sérum physiologique,
- le groupe Sham/TNBS : pas de stimulation et instillation intracolique de TNBS,
- le groupe VNS/TNBS : stimulation vagale et instillation intracolique de TNBS.

L'ensemble des animaux, quel que soit leur groupe, a donc été implanté avec une électrode de stimulation et un capteur télémétrique.

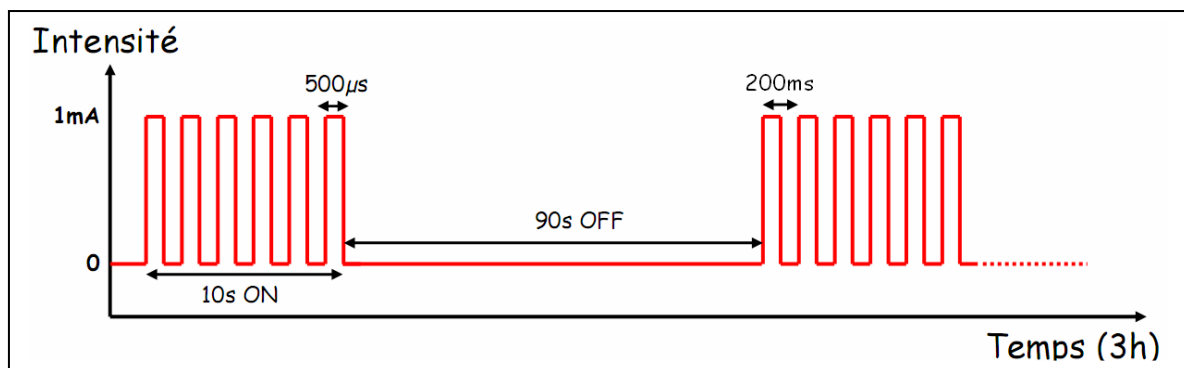
### 1.4 Stimulation vagale

Une période de récupération de douze jours a été laissée aux animaux. La stimulation a débuté 1h avant l'instillation et a été effectuée durant 3h par jour (9h-12h) pendant 5 jours consécutifs chez des animaux vigiles. Les paramètres de stimulation, adaptés à partir de plusieurs études (Naritoku *et al.*, 1995; Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik

*et al.*, 2002a; Miceli & Jacobson, 2003) et connus pour activer les efférences vagales (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a) étaient les suivants :

- intensité : 1mA,
- fréquence : 5 Hz,
- durée du pulse : 500 $\mu$ s,
- trains de stimulation : 10s ON, 90s OFF.

Le profil de la stimulation est schématisé sur la figure 21.



**Figure 21** : schéma de la stimulation électrique.

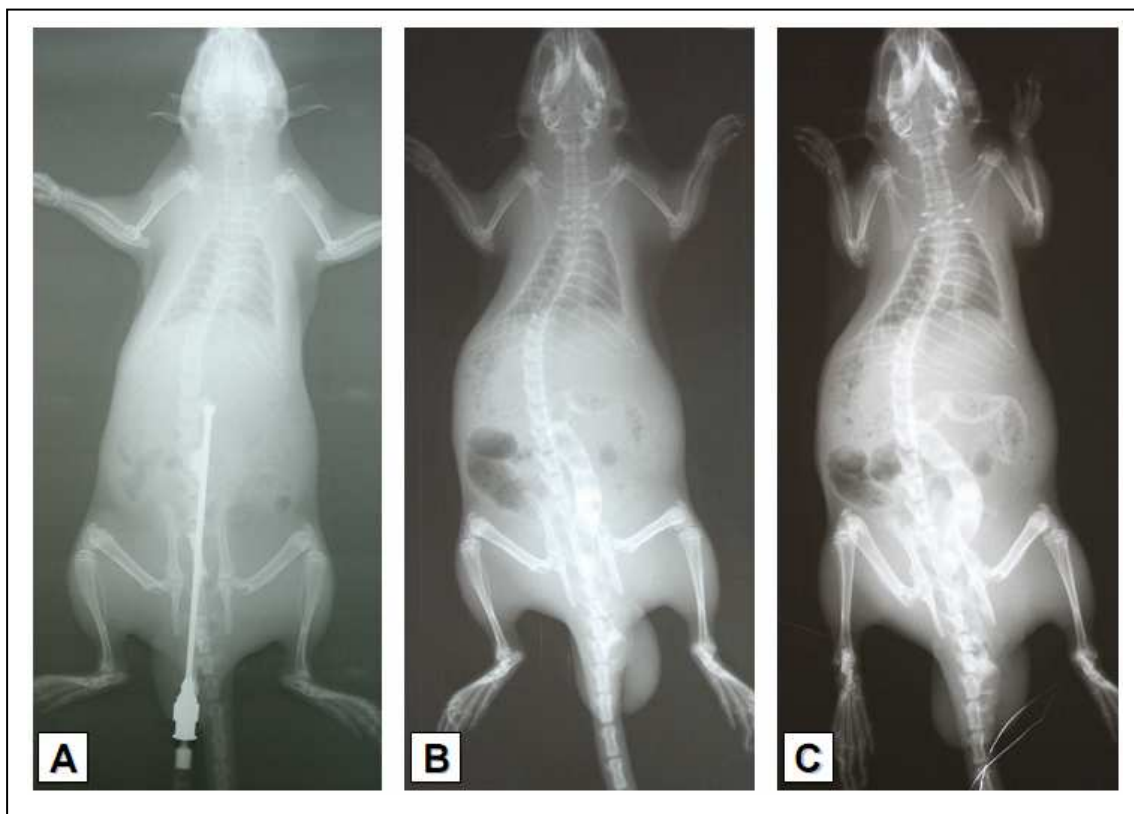
## 1.5 Colite au TNBS

Nous avons opté pour un modèle expérimental de colite induite par l'instillation intracolique de TNBS (Fluka, St Quentin Fallavier, France) (Morris *et al.*, 1989; Miceli & Jacobson, 2003). Le modèle expérimental a été choisi pour plusieurs raisons :

- il est bien maîtrisé et caractérisé au sein du laboratoire (Porcher *et al.*, 2004; Sinniger *et al.*, 2005),
- il présente des homologues avec la MC,
- dans ce modèle, l'inflammation est induite rapidement (contrairement au DSS), ce paramètre est important pour cette expérience puisque les rats sont chroniquement implantés avec l'électrode de stimulation et les risques de désimplantation augmentent avec le temps.

Nous avons adapté les conditions expérimentales d'inflammation en ajustant la dose (250µL de TNBS, soit 30mg/kg, dilution dans 50% d'éthanol) afin de diminuer le taux de mortalité dû à l'induction de la colite.

L'instillation a été réalisée sur des rats à jeun depuis 12h et 1h après le début de la première stimulation. Les rats ont été légèrement anesthésiés (kétamine (50mg/kg)/acépromazine (0,05mg/kg) IM), pesés, puis une canule remontant jusqu'à l'angle colique gauche (Figure 22) (16G, 7,5cm de longueur, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) a été introduite dans le côlon via l'ano-rectum afin de réaliser l'instillation. Les rats ont ensuite été mis en position de décubitus ventral déclive (abdomen surélevé) jusqu'à leur réveil afin d'éviter l'expulsion immédiate du TNBS. Les rats des groupes contrôles et VNS/Salin ont reçu une injection de 250µL de sérum physiologique. Ce volume de 250µL est couramment utilisé et permet une diffusion du liquide du côlon transverse au côlon distal (figure 22). Les rats avaient ensuite un accès libre à l'eau et à la nourriture jusqu'à la fin de l'expérimentation.



**Figure 22** : étude radiographique du volume d'injection intracolique. Injection de 250µL de liquide de contraste (Télébrix, Guerbet, Bobigny, France) dans le côlon.

**A** : avant injection avec la canule en place ; **B** : 5 min après instillation ; **C** : 30 min après instillation.

## **1.6 Euthanasie et prélèvements**

Cinq jours après l'instillation, les rats ont été profondément anesthésiés (kétamine (150mg/kg)/acépromazine (0,15mg/kg) IM) et pesés. Une laparo-thoracotomie a été pratiquée et les rats ont été perfusés avec 150mL de sérum physiologique (NaCl : 0,9%) durant 10 min grâce à une canule intracardiaque. Les différents prélèvements digestifs ont ensuite été effectués :

- portion du colon lésée (de 3 à 7cm au-dessus de l'anus),
- portion du colon immédiatement au-dessus de la lésion, inflammatoire mais non lésée macroscopiquement.

Après ouverture longitudinale et photographie, chacune des portions a été partagée longitudinalement en quatre pour analyses :

- histologique,
- protéique par les méthodes ELISA, et western blot,
- des ARNm par la technique de RT-PCR,
- immunohistologique de marqueurs inflammatoires.

## **1.7 Marqueurs étudiés**

### *1.7.1 Par télémetrie : température corporelle et activité locomotrice*

L'implantation du capteur de télémetrie au niveau intra-abdominal permet l'enregistrement de la température corporelle et de l'activité locomotrice des animaux. Le système a été programmé afin de réaliser un enregistrement de 30 sec toutes les 2 minutes de ces deux paramètres. Les données ont été recueillies tout au long de l'expérience à partir de l'implantation. Ce système présente l'avantage de pouvoir visualiser plus précisément l'état de santé des animaux par l'intermédiaire des cycles circadiens de température corporelle et d'activité locomotrice. Cela nous a permis d'observer, dès le début de l'expérimentation, qu'environ 10 jours étaient nécessaires aux rats pour récupérer totalement de la chirurgie d'implantation et de la connexion à la chaîne de stimulation. C'est en particulier pour cette raison que la stimulation vagale et l'instillation intracolique ont été réalisées 12 jours après la chirurgie. Au terme de l'expérience, l'ensemble des enregistrements de télémetrie a été vérifié (élimination des artéfacts), les données concernant l'activité locomotrice ont été normalisées par un calcul du z-score pour chacun

des rats en utilisant comme référence l'activité locomotrice enregistrée deux jours avant l'instillation (Chevrier *et al.*, 2006). La période de référence de 24h a été choisie en évitant la veille de l'instillation durant laquelle les rats ont été mis à jeun. En effet la mise à jeun entraîne quelques perturbations des rythmes circadiens de température et d'activité locomotrice. La température corporelle et l'activité locomotrice ont ensuite été moyennées par heure et pour chacun des groupes d'animaux.

#### 1.7.2 Poids des animaux

Les rats ont été pesés au moment de l'instillation (poids initial, à J0) et au moment de l'euthanasie (poids final, à J4). Nous avons ainsi pu voir l'évolution du poids des animaux de l'induction de l'inflammation jusqu'à la fin de l'expérimentation.

#### 1.7.3 Surface des lésions

Au moment du sacrifice, les prélèvements digestifs ont été photographiés afin de réaliser, une analyse des lésions du côlon par analyse colorimétrique (Diop *et al.*, 2002). Nous avons utilisé le logiciel Visilog 6 (NOESIS, Crolles, France), afin de déterminer quatre zones en fonction de leur niveau de couleurs : normale, inflammatoire, nécrotique et artéfactuelle (reflets).

#### 1.7.4 Analyse histologique du côlon

Les prélèvements tissulaires issus de 12 rats (3 rats par groupe) ont été conditionnés selon la méthode suivante : fixation dans le formol salin (10%) et inclusion dans la paraffine. Des coupes tissulaires (5µm) et une coloration à l'hémaréose et à l'éosine (H&E) ont ensuite été réalisées. L'analyse histologique a ensuite été effectuée en aveugle par un laboratoire d'anatomopathologie vétérinaire (Vétopath, Sophia-Antipolis, France).

L'évaluation de la sévérité de l'inflammation a été réalisée par examen de la structure tissulaire, de la taille de vaisseaux sanguins et de l'infiltrat de cellules

inflammatoires (Geboes *et al.*, 1999). Les changements tissulaires ont été classés selon cinq grades :

- grade 0 : tissu normal,
- grade I : inflammation légère, infiltration subaiguë localisée,
- grade II : inflammation modérée, infiltration localisée ou diffuse au niveau de la lamina propria,
- grade III : inflammation sévère avec ulcération et nécrose superficielle,
- grade IV : inflammation sévère avec nécrose transpariétale.

#### 1.7.5 Quantification de l'expression de la myéloperoxidase

Le dosage de la myéloperoxidase (MPO) est classique dans les modèles d'inflammation (Morris *et al.*, 1989; Tateishi *et al.*, 1997; Ghia *et al.*, 2007). En effet, la MPO, enzyme des polynucléaires neutrophiles est classiquement utilisée comme mesure de l'intensité de l'inflammation. Les prélèvements digestifs réalisés au moment du sacrifice ont été congelés par immersion dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Ceux-ci ont ensuite été broyés avec des billes de silice (Lysing matrix D, FastPrep-24 Instrument Device, Qbiogen, Illkirch, France). L'ensemble de ce processus d'extraction des protéines a été réalisé à 4°C et dans une solution de PBS-EDTA (0,05M-5mM, pH : 7,3) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete Roche EDTA-free, Roche Diagnostics, Meylan, France). Les lysats ont ensuite été conservés à -80°C. Puis un dosage ELISA de la MPO a été réalisé grâce à un kit (HK210, Hycult biotechnology, Uden, The Netherlands).

#### 1.7.6 Dosage des ARNm par RT-PCR

Les échantillons digestifs, recueillis lors de l'euthanasie ont été conservés dans une solution de RNALater (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis broyés dans un tampon de lyse (Qiagen). Les ARNm totaux de chacun des échantillons ont ensuite été isolés par le kit MagNA Pure LC mRNA isolation kit II par l'automate MagNA Pure LC (Roche Applied Science, Roche Diagnostics). La « transcription reverse » a été réalisée avec 4µL de solution d'ARNm dans 10µL en utilisant le kit Reverse Transcriptase Core (Eurogentec, Angers, France), avec 50µM d'amorce oligo (dT) 15 et 2U d'inhibiteur de RNase.

Les amorces ont été dessinées et optimisées selon l'expérience du laboratoire (Peinnequin *et al.*, 2004) (tableau 2) afin de permettre la quantification des ARNm de plusieurs protéines mises en jeu dans l'inflammation :

- ARNm de cytokines : IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 et TNF $\alpha$ ,
- ARNm de facteurs de transcription : T-box 21, exprimé principalement dans les cellules Th1,
- ARNm de protéines modulant les voies intracellulaires de signalisation : SOCS3 (suppressor of cytokine signalling 3) connu pour interagir avec la protéine JAK2 ; NF $\kappa$ B (nuclear factor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B-cells inhibitor  $\alpha$ ) inhibiteur de NF $\kappa$ B,
- ARNm de protéine de l'adhérence cellulaire : ICAM1.

| Gène                            | Amorces  |                                   | Réf. GenBank | TH   | NC |
|---------------------------------|----------|-----------------------------------|--------------|------|----|
| <b>ARB</b>                      | Sens     | 5'- CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG -3'    | NM_022402    | 57°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG -3'    |              |      |    |
| <b>CycA</b>                     | Sens     | 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG -3'   | NM_017101    | 58°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'     |              |      |    |
| <b>HPRT</b>                     | Sens     | 5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC -3' | NM_012583    | 60°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC -3' |              |      |    |
| <b>ICAM1</b>                    | Sens     | 5'- AATCCAGCCCCTAATCTGACCTG -3'   | NM_053565    | 58°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- CCGTTTGACAGACT TCACCATCC -3'  |              |      |    |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>   | Sens     | 5'- CACCTCTCAAGCAGAGCACAG -3'     | NM_031512    | 58°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC -3'     |              |      |    |
| <b>IL-6</b>                     | Sens     | 5'- GCGATGATGCACTGTCAGAAAAC -3'   | NM_012589    | 60°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- AACGGAACCCAGAAAGACCAGAG -3'   |              |      |    |
| <b>NF<math>\kappa</math>BIA</b> | Sens     | 5'- AGCTGACCCTGGAATCTTCAG -3'     | XM_343065    | 57°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG -3'  |              |      |    |
| <b>SOCS3</b>                    | Sens     | 5'- CCTCCAGCATCTTTGTCGGAAGAC -3'  | NM_053565    | 58°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'-TACTGGTCCAGGAATCCCGAATG -3'    |              |      |    |
| <b>T-box 21</b>                 | Sens     | 5'- CCTTCCAAGAGACCCAGTTCATTG -3'  | XM_220914    | 56°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- TTTGGCAAAGGGGTTGTTGTC -3'     |              |      |    |
| <b>TNF<math>\alpha</math></b>   | Sens     | 5'- AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC -3'  | NM_012675    | 58°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC -3'   |              |      |    |
| <b>IL-10</b>                    | Sens     | 5'- ATCTCCCTGCCATCACTCTGC -3'     | X_60675      | 56°C | 45 |
|                                 | Antisens | 5'- CAAACAATACGCCATTCCCAAG -3'    |              |      |    |

**Tableau 2** : Gènes étudiés et condition de la RT-PCR.

**TH** : température d'hybridation ; **NC** : nombre de cycles ; **ARB** : acidic ribosomal phosphoprotein ; **CycA** : cyclophilin A ; **HPRT** : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase ; **ICAM1** : intercellular adhesion molecule-1 ; **IL-1 $\beta$**  : interleukin-1 $\beta$  ; **IL-6** : interleukin-6 ; **NF $\kappa$ BIA** : nuclear factor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B-cells inhibitor  $\alpha$  ; **SOCS3** : suppressor of cytokine signalling 3 ; **TNF $\alpha$**  : tumor necrosis factor  $\alpha$ . **En rouge** : les gènes rapporteurs

Les PCR ont été réalisées grâce au kit LC Fast Start DNA Master SYBR Green (Roche Applied Science) avec 0,5µL d'ADNc dans un volume de 20µL (4mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM pour le TNFα ; et 0,4µM d'amorce (0,5µM et 0,6µM pour SOCS3 et l'IL6 respectivement). Les PCR ont été menées par 45 cycles d'amplification : 20sec à 95°C, 5sec à 56, 57, 58 ou 60°C selon les gènes (voir tableau 2) et 10sec à 72°C grâce au système Lightcycler (Roche Applied Science). Le Cp (crossing point), dernier cycle auquel la PCR est exponentielle, a été calculé grâce au logiciel Lightcycler Software v.3.5 (Roche Applied Science). La quantification a été réalisée en utilisant un pool de tous les échantillons comme calibreur selon la méthode de comparaison des cycles (Schmittgen & Livak, 2008) avec normalisation par la moyenne géométrique des 3 gènes rapporteurs (ARBP : acidic ribosomal phosphoprotein ; CycA : cyclophyline A ; HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosil transferase) (Pfaffl, 2001; Vandesompele et al., 2002). La variation de ces 3 gènes rapporteurs, au-dessus de la lésion (0,100) et dans la lésion (0,095), est demeurée inférieure au seuil de 0,150 qui aurait impliqué l'addition d'un gène rapporteur supplémentaire. Nous avons donc utilisé les gènes ARBP, CycA et HPRT pour normaliser les quantités respectives de chacun des marqueurs d'inflammation étudiés.

## **1.8 Analyse discriminante**

L'inflammation faisant intervenir un grand nombre de facteurs agissant au final de manière synergique ou antagoniste, il nous est apparu intéressant d'étudier l'inflammation non pas uniquement par l'intermédiaire de paramètres isolés, mais aussi avec une approche multiparamétrique (Vodovotz *et al.*, 2008; Vodovotz *et al.*, 2009). Nous avons donc réalisée une étude multivariée, prenant en compte plusieurs paramètres en même temps, pour cela nous avons effectué une analyse discriminante. Celle-ci nous a permis d'obtenir non seulement l'importance relative, dans la colite, de chacun des paramètres utilisés au départ, mais aussi un index général caractérisant l'inflammation induite par le TNBS. Cette analyse a tenu compte de facteurs physiologiques (température corporelle et activité locomotrice), tissulaires (surface des lésions), et moléculaires (dosages d'ARNm : TNFα, IL-1β, IL-6, ICAM1, NFκBIA, SOCS3, TBX21). Nous avons alors obtenu un index global

caractérisant la colite à partir de facteurs des trois niveaux d'étude (intégré, tissulaire et moléculaire).

Dans un premier temps, afin de caractériser la colite elle-même, l'analyse discriminante a été réalisée en comparant le groupe contrôle et le groupe colite (Sham/TNBS). Nous avons ainsi obtenu pour chacun des paramètres son importance relative dans la colite (coefficient standard) mais également un coefficient non standard.

Le coefficient non standard nous a permis, dans un deuxième temps, de calculer un index global pour chacun des rats en utilisant la formule suivante :

$$\text{Index} = \text{Fact. A} \times \text{Val. A du rat 1} + \text{Fact. B} \times \text{Val. B du rat 1} + \text{Fact. C} \times \text{Val. C du rat 1} \dots$$

Nous avons appliqué cette formule aux paramètres des animaux issus des 4 groupes. Tous les paramètres entrant en jeu dans l'inflammation, nous les avons tous conservés, y compris lorsque leur importance était faible, pour obtenir l'index d'inflammation le plus global possible. La moyenne de l'index pour chacun des groupes a ensuite été calculée et nous avons traité celle-ci avec le même type d'analyse statistique que chacun des autres résultats (test de Mann-Whitney-Wilcoxon).

## **1.9 Les voies intracellulaires mises en jeu**

Afin de mieux caractériser les voies intracellulaires et la nature des cellules immunitaires mises en jeu lors de la VNS, nous avons réalisé l'étude de l'expression de facteurs de transcription, intervenant dans les cascades intracellulaires activées durant l'inflammation (notamment par la liaison cytokine-récepteur). Ces analyses ont été faites par les méthodes de western blot et d'immunohistochimie. Les facteurs de transcription principalement activés sont les « Signal transducer and activator of transcription » (STAT). Ces molécules sont activées par phosphorylation via les récepteurs aux cytokines (Wurster *et al.*, 2000), puis, celles-ci vont être transloquées dans le noyau où elles vont moduler la transcription de gènes spécifiques de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires notamment). En fonction du type de cellules immunitaires, et du type d'inflammation, les

STAT exprimées sont différentes (Wurster *et al.*, 2000; Lovato *et al.*, 2003; Mudter *et al.*, 2005; The *et al.*, 2007; Alex *et al.*, 2008; O'Malley *et al.*, 2008):

- les STAT3 sont principalement exprimées par les macrophages,
- les STAT4 sont principalement exprimées par les lymphocytes Th2 ,
- les STAT6 sont principalement exprimées par les lymphocytes Th1 et Th17.

### **1.9.1 Anticorps**

Les anticorps primaires anti- STAT3, STAT3 phosphorylée (STAT3-P), STAT4, STAT4-P proviennent de chez Signalway Antibody (Euromedex, Souffelweyersheim, France), l'anticorps anti-STAT6 de chez USBiological (Swampscott, Massachusetts, USA), l'anticorps anti-STAT6-P de chez American Research Product (Belmont, Massachusetts, USA), l'anticorps anti-actine de chez Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau, France). Les anticorps secondaires biotinylés ou couplés à la peroxydase ont été achetés chez les Laboratoires Vector (Abcys, Paris, France) et Jackson immunoresearch (Immunotech, Marseille, France) respectivement.

### **1.9.2 Western blot**

Les échantillons utilisés pour l'analyse par western blot ont été traités avec la même méthode de conservation et d'extraction que ceux pour le dosage de la MPO. Dans un premier temps, les protéines totales de chacun des échantillons ont été dosées par la technique du BCA (Pierce, Rockford, IL, US) selon les instructions du fabricant. Les échantillons ont ensuite été préparés pour le western blot : ajout du bleu de Leamli (20%) et dénaturation par chauffage 5 min à 95°C. Nous avons ensuite déposé des volumes contenant 13 ou 15µg de protéines sur des gels à 10% d'acrylamide, puis réalisé un transfert sur membranes PVDF (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Après incubation des membranes dans la solution de saturation (TBS 24mM, 3% BSA, 0,1% Tween 20) durant 1h à température ambiante, les membranes ont été incubées durant une nuit à 4°C dans la solution de saturation contenant l'anticorps primaire (dilution : 1/1000). Trois lavages de 10 min ont ensuite été effectués dans la solution de rinçage (TBS 24mM, 0,1% Tween 20), puis les membranes ont été incubées 1h à température ambiante en présence de

l'anticorps secondaire (1/20.000) dilué dans la solution de saturation. Après trois lavages de 10 min dans la solution de rinçage, et un dernier lavage de 10 min dans une solution de PBS-NaCl (500mM), la révélation a été réalisée par chimiluminescence (ECL westernblotting reagent, GE Healthcare) sur films radiographiques (GE Healthcare). Une quantification a finalement été effectuée avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). L'ensemble des quantifications a été rapporté sur la quantité d'actine présente sur chacun des blots (Chartier *et al.*, 2006).

### **1.9.3 Immunohistochimie (IHC)**

Les échantillons ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (4% ; 0,1M de borax) pendant 24h, puis transférés dans une solution identique contenant 30% de sucrose à 4°C pendant 5 jours. Les tissus ont ensuite été congelés dans la carboglace puis des coupes transversales de 16µm ont été réalisées au cryostat (Microm HM500M, Francheville, France) et montées sur des lames Superfrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Allemagne).

Une fixation complémentaire a été réalisée dans une solution d'acétone à -20°C pendant 10 min, puis la peroxydase tissulaire endogène a été inhibée par une incubation de 30 min dans une solution de méthanol contenant 3% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les lames ont ensuite été incubées 30 min dans la solution de saturation (PBS, 1% de sérum de chèvre), puis incubées 1h en présence de l'anticorps primaire dilué (1/1000) dans la solution de saturation. L'anticorps secondaire (kit PK-6101, Vector Laboratories, L'Isle d'Abeau, France) a été appliqué lors d'une incubation de 30 min. La solution contenant le complexe avidine/biotine (Vectastain kit, Vector Laboratories) a ensuite été appliquée durant 30 min, et la révélation à l'aide de la solution de DAB (kit SK-4100, Vector Laboratories) a été effectuée. Nous avons enfin terminé par une contre-coloration à l'hématoxyline avant de sécher, dégraisser et monter les lames dans du DPX (VWR, Leicestershire, Angleterre). Des séries de lavages avec une solution de PBS ont été réalisées entre chacune de ces étapes sauf entre la saturation et l'incubation avec l'anticorps primaire.

Les lames ont ensuite été analysées au microscope (Axioskop, Carl Zeiss, Zaventem, Belgique) et photographiées grâce à une caméra numérique (Color Mosaic 11.2, Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI, US).

### **1.10 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux programmes Statistica 8.0 (Statsoft-France, Maison-Alfort, France) et Kaleidagraph 3.6 (Synergy Software, Ritme informatique, Paris, France). Les données de télémétrie ont été traitées par analyse de variance (ANOVA) répétée, avec un test post-Hoc de comparaison de Bonferoni (Chevrier *et al.*, 2006). L'ensemble des autres résultats a été analysé par un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les valeurs sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ , tous les résultats sont présentés de la manière suivante : moyenne  $\pm$  erreur standard.

## 2 *Résultats*

### 2.1 **Télémétrie : température corporelle et activité locomotrice**

Le système de télémétrie nous a permis de suivre les variations circadiennes de température corporelle et d'activité locomotrice spontanée dès la fin de la chirurgie d'implantation et jusqu'à l'euthanasie des animaux. Dix jours après la chirurgie, les quatre groupes d'animaux récupèrent des rythmes circadiens de température corporelle et d'activité locomotrice normaux. Le rat, espèce nocturne, montre ainsi une température corporelle et une activité locomotrice supérieures durant la période d'obscurité (20h-8h) par rapport à la période éclairée (8h-20h) (figures 23A et 24A) :

- températures :  $38,2 \pm 0,1$  °C en période sombre et  $37,2 \pm 0,1$  °C en période éclairée,
- locomotions :  $0,7 \pm 0,2$  UA en période sombre et  $0,3 \pm 0,1$  UA en période éclairée.

Les rythmes circadiens normaux se poursuivent jusqu'à l'anesthésie nécessaire pour réaliser l'instillation les animaux, avec toutefois de légères variations dues à la mise à jeun la veille de l'instillation (non montré). Comme le montrent les figures 23A et 24A, les quatre groupes d'animaux ont des rythmes identiques avant l'instillation.

Le jour de l'instillation (J0) les rats sont anesthésiés (kétamine) pour permettre l'injection du TNBS ou du sérum physiologique. Il en résulte une hypothermie ( $-2^{\circ}\text{C}$  en moyenne), visible chez les quatre groupes (moyenne :  $35,2 \pm 0,7$  °C), l'hypothermie la plus importante étant observée chez le groupe Sham/TNBS ( $34,9 \pm 0,7$  °C) (figure 23B). L'hypothermie est suivie par une légère hyperthermie, et par une hyperactivité au moment de la phase de réveil chez l'ensemble des quatre groupes avec un retour à une activité normale 6h après l'anesthésie (figure 23B et 24B).

- A partir de la nuit suivante, les deux groupes ayant reçu une instillation de sérum physiologique (Sham/Salin, et VNS/Salin) reprennent un cycle circadien de température corporelle normale (figure 23C), toutefois, l'activité locomotrice spontanée demeure réduite durant cette période par rapport à la nuit de référence avant l'instillation (figure

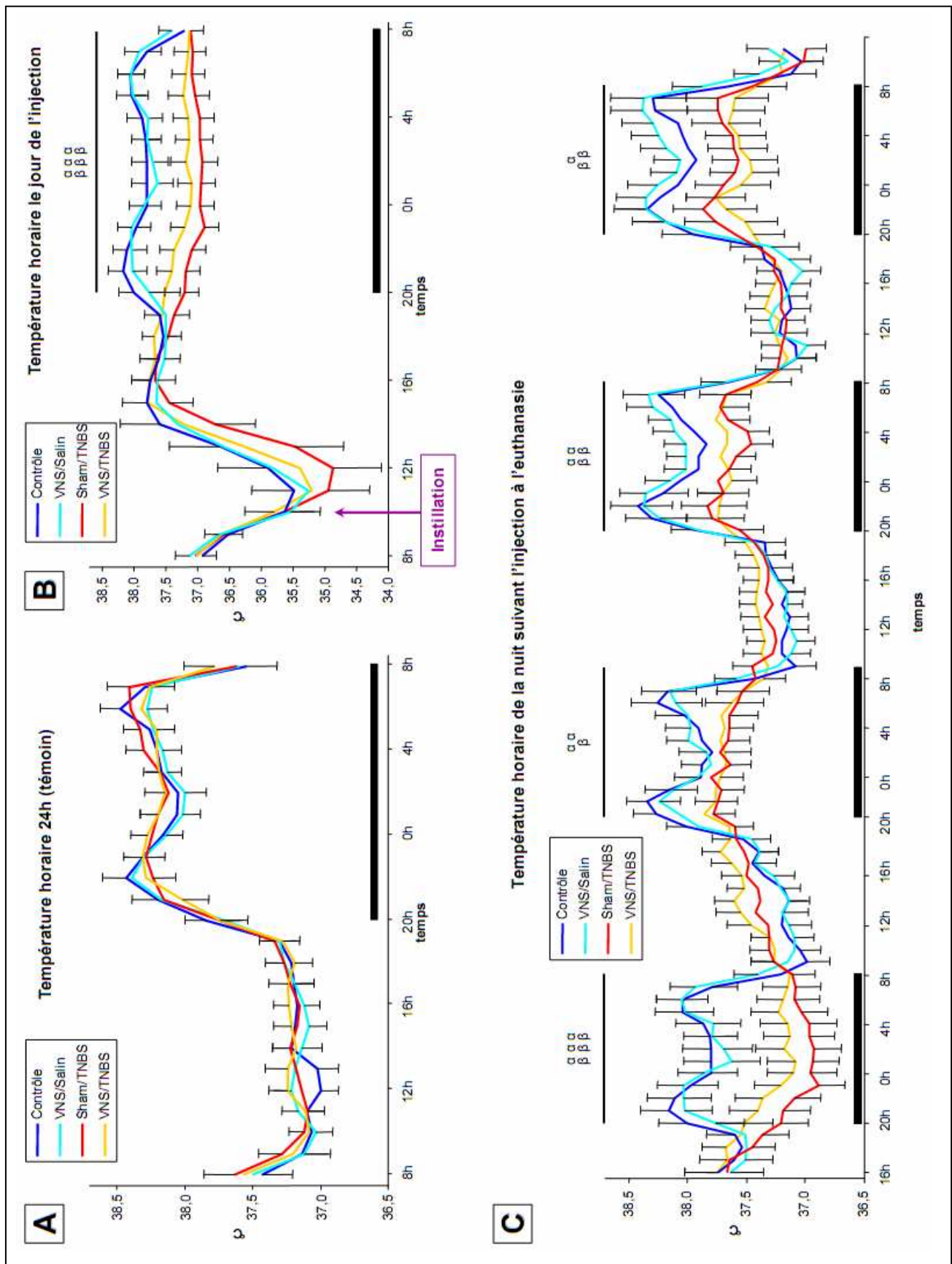
24A et C). L'activité locomotrice revient à la normale dès la deuxième nuit suivant l'instillation pour ces deux groupes (figure 24C).

- Les deux groupes ayant reçu le TNBS (Sham/TNBS et VNS/TNBS) présentent une altération des rythmes circadiens de température corporelle et d'activité locomotrice spontanée. Durant les périodes sombres, une hypothermie et une réduction de la locomotion apparaissent et perdurent quasiment jusqu'à la fin de l'expérimentation (J4). Durant les périodes éclairées, les activités locomotrices sont comparables à celle du groupe contrôle, concernant la température corporelle, c'est une hyperthermie qui est visible durant cette période et cela durant les 3 jours suivant l'instillation (J0-J4).

La VNS a plusieurs effets durant les 24h suivant l'instillation mais ceux-ci sont statistiquement non significatifs :

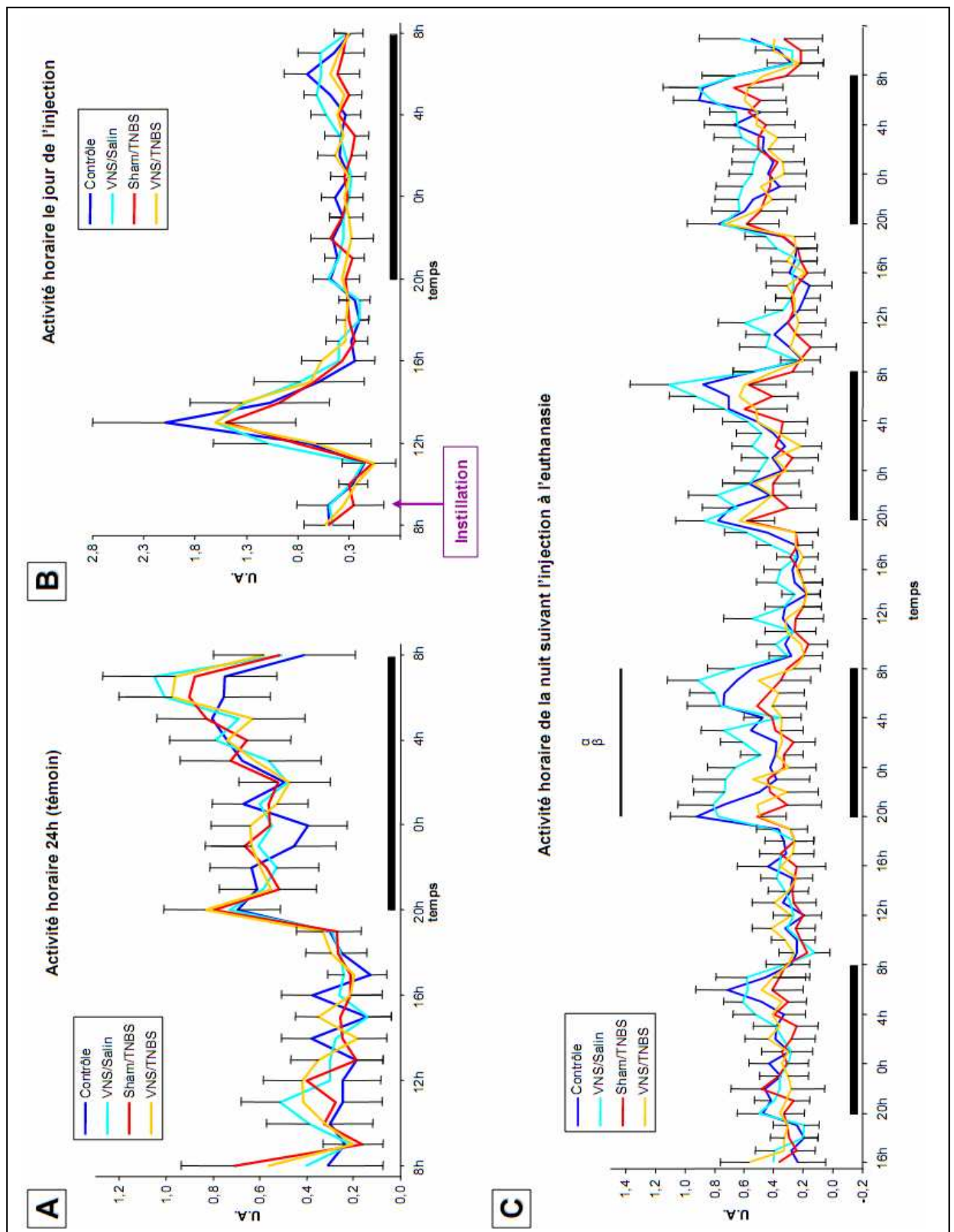
- 1) elle semble diminuer l'hypothermie induite par l'anesthésie au moment de l'instillation (figure 23B). En effet les rats VNS/TNBS montrent une hypothermie un peu moins importante que les rats Sham/TNBS.
- 2) elle semble diminuer l'hypothermie induite par le TNBS durant la période sombre (figure 23B).

La VNS n'induit aucune modification visible au niveau de l'activité locomotrice spontanée (figure 24B et C).



**Figure 23** : rythmes circadiens de température corporelle.

**A** : période référence ; **B** : Température le jour de l'instillation (J0) ; **C** : température jusqu'à l'euthanasie (J0-J4). Les barres sombres horizontales représentent la période sombre (nuit). α : Contrôle vs Sham/TNBS ; β : Contrôle vs VNS/TNBS ; α/β :  $p < 0,05$  ; αα/ββ :  $p < 0,01$  ; ααα/βββ :  $p < 0,001$ .



**Figure 24** : rythmes circadiens d'activité locomotrice spontanée.

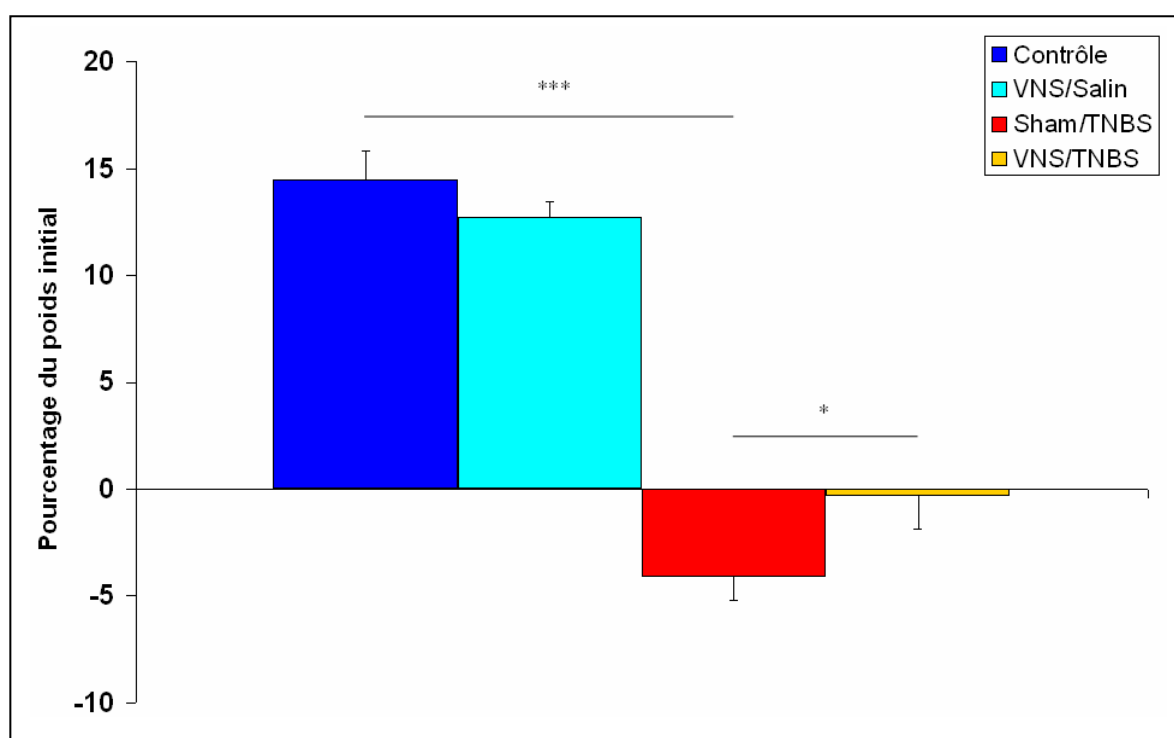
**A** : période référence ; **B** : locomotion le jour de l'instillation (J0) ; **C** : locomotion jusqu'à l'euthanasie (J0-J4). **U.A.** : unité arbitraire. Les barres sombres horizontales représentent la période sombre (nuit).  $\alpha$  : Contrôle vs Sham/TNBS ;  $\beta$  : Contrôles vs VNS/TNBS.  $\alpha/\beta$  :  $p < 0,05$ ,  $\alpha\alpha/\beta\beta$  :  $p < 0,01$  ;  $\alpha\alpha\alpha/\beta\beta\beta$  :  $p < 0,001$

## 2.2 Evolution du poids

La figure 25 illustre l'évolution relative du poids des animaux entre le jour de l'instillation (J0 : poids initial) et le jour de l'euthanasie (J4 : poids final) (Figure 15). Les deux groupes recevant une instillation de salin ont une évolution positive du poids avec  $+14,5 \pm 1,3$  % pour le groupe contrôle et  $+12,7 \pm 0,7$  % pour le groupe VNS/Salin.

L'instillation de TNBS provoque une diminution du poids des animaux. Ainsi, au moment du sacrifice, les rats Sham/TNBS montrent une perte de poids ( $-4,1 \pm 1,0$  %) significativement différente ( $p < 0,0001$ ) par rapport au groupe contrôle ( $14,5 \pm 1,3$  %).

Au contraire, le groupe VNS/TNBS présente pour sa part une très légère perte de poids de  $-0,3 \pm 1,5$ , soit une amélioration significative ( $p = 0,04$ ) par rapport au groupe non stimulé ( $-4,1 \pm 1,0$  %).



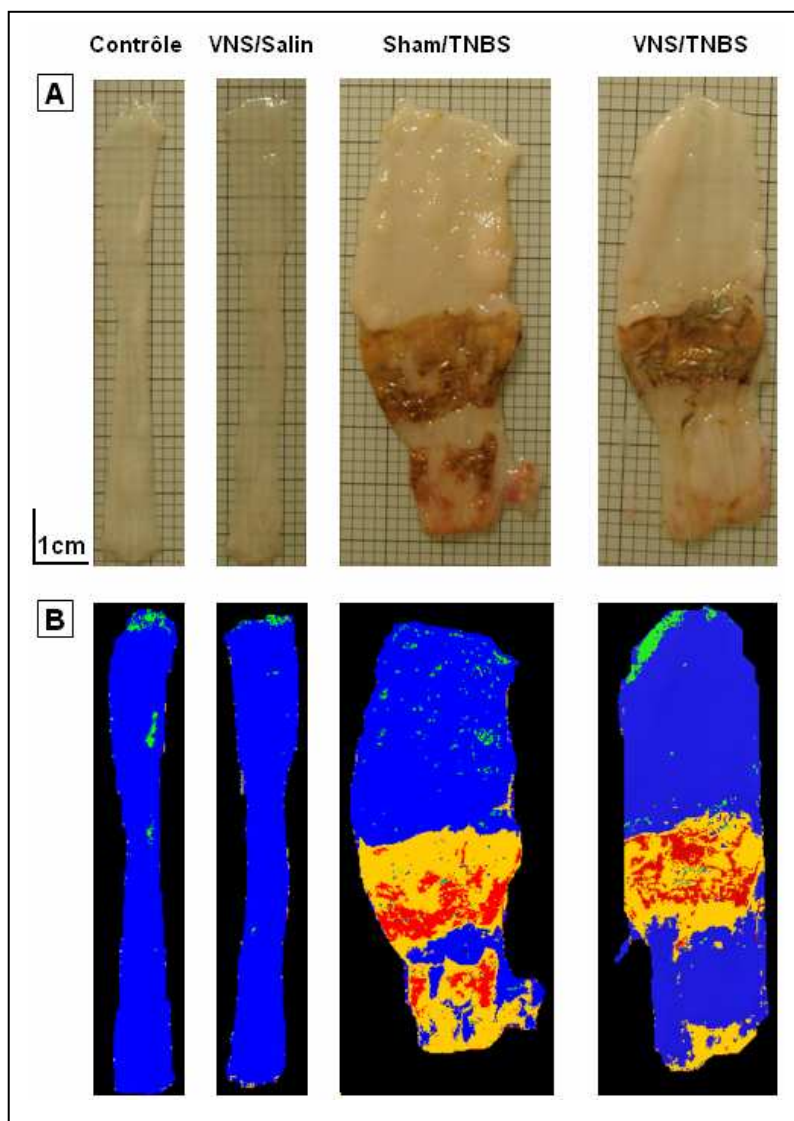
**Figure 25** : évolution du poids des animaux (entre J0 et J4).

\* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

## 2.3 Surface des lésions

Au moment de l'euthanasie, les colons distaux ont été photographiés avant d'être traités pour les dosages des différents marqueurs étudiés. A partir des clichés réalisés, nous avons pu effectuer une quantification colorimétrique des surfaces lésionnelles.

Les rats ayant reçu une instillation de sérum physiologique présentent un colon dépourvu de toute lésion et de toute anomalie (figure 26 et 27).



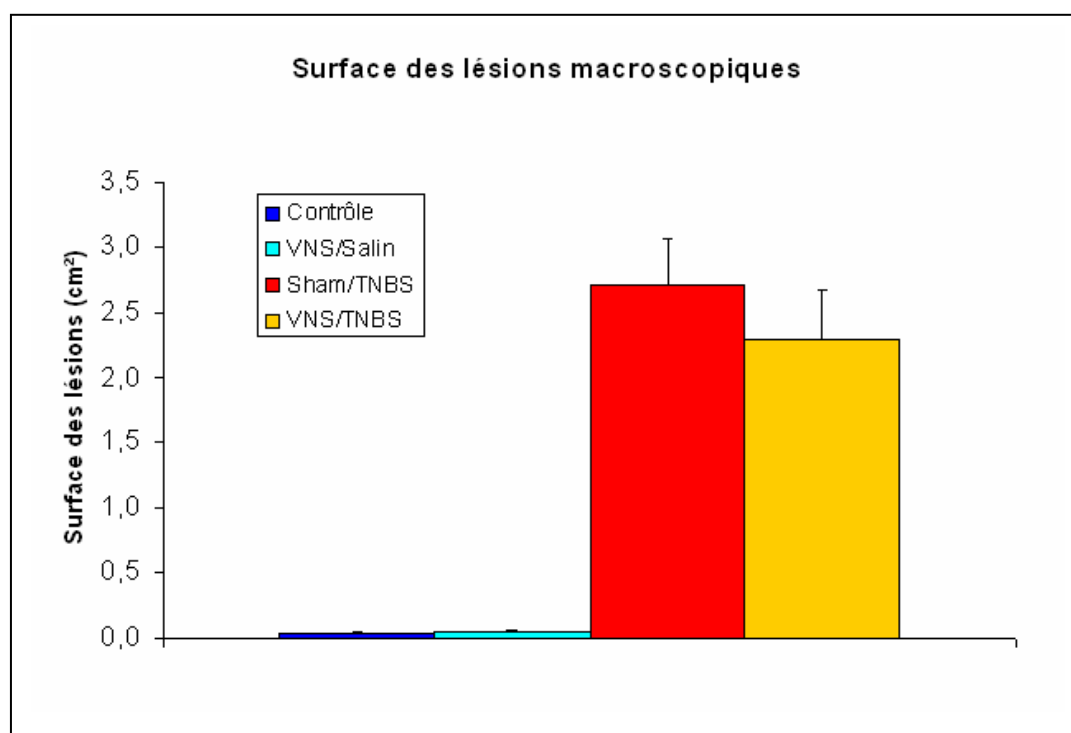
**Figure 26** : analyse macroscopique des lésions.

**A** : lésions macroscopiques représentatives au niveau de colons distaux ; **B** : quantification colorimétrique des surfaces lésionnelles.

Les rats ayant reçu une instillation de TNBS montrent pour leur part des lésions au niveau du côlon distal. Ces lésions sont généralement situées entre 3 et 7 cm au dessus de

l'anus (figure 26). En revanche, aucune lésion macroscopique n'a été observée en dehors du côlon. La surface moyenne des lésions observées dans le groupe Sham/TNBS est de  $2,7 \pm 0,4 \text{ cm}^2$  (figure 27).

En ce qui concerne le groupe VNS/TNBS, les surfaces lésées sont inférieures au groupe Sham/TNBS ( $2,3 \pm 1,3 \text{ cm}^2$ ) mais de manière non significative (figure 27).

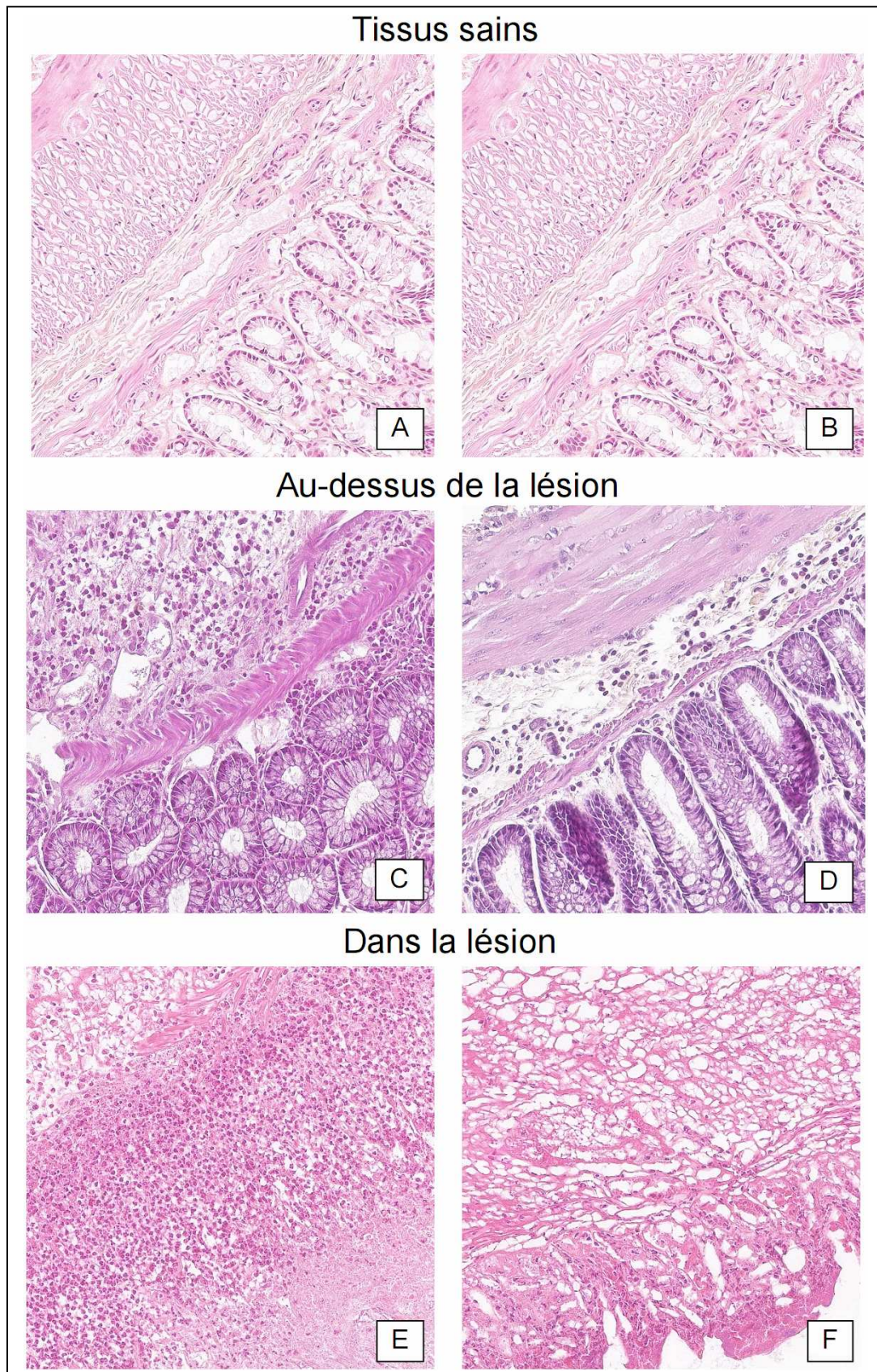


**Figure 27** : surface moyenne des lésions au niveau du colon distal.

## 2.4 Analyse histologique

L'examen histologique ne montre aucune lésion ou modification tissulaire chez les animaux ayant reçu le sérum physiologique (Sham/Salin et VNS/Salin).

Par contre, le TNBS induit des lésions au niveau du tissu colique. Les dommages engendrés sont transpariétaux : les lésions touchent l'épithélium et s'étendent parfois jusqu'à la musculuse et à la séreuse. Le TNBS engendre une déstructuration tissulaire, une dilatation des vaisseaux sanguins, la formation d'œdèmes, ainsi qu'une infiltration de cellules immunitaires et plasmatiques (lymphocytes, polynucléaires), notamment au niveau de la sous-muqueuse et de la lamina propria (figure 28).



**Figure 28** : photographies des tissus coliques (coloration H&E) (grossissement d'observation X20).  
**Tissus sains** : **A** : Sham/Salin ; **B** : VNS/Salin ; **au-dessus de la lésion** : **C** : Sham/TNBS ;  
**D** : VNS/TNBS ; **dans la lésion** : **E** : Sham/TNBS et **F** : VNS/TNBS dans la lésion.

|           | Au-dessus de la lésion | Dans la lésion |
|-----------|------------------------|----------------|
| Contrôle  | 0                      | 0              |
|           | 0                      | 0              |
|           | 0                      | 0              |
| VNS/Salin | 0                      | 0              |
|           | 0                      | 0              |
|           | 0                      | 0              |
| Sham/TNBS | 0                      | II             |
|           | II                     | IV             |
|           | II                     | IV             |
| VNS/TNBS  | 0                      | I              |
|           | 0                      | IV             |
|           | I                      | IV             |

**Tableau 3 :** analyse anatomopathologique des tissus coliques.

**0** : grade 0, tissu normal ; **I** : grade I, inflammation légère, infiltration subaiguë localisée ; **II** : grade II, inflammation modérée, infiltration localisée ou diffuse au niveau de la lamina propria ; **III** : grade III, inflammation sévère avec ulcération, nécrose superficielle ; **IV** : grade IV : sévère inflammation avec nécrose transpariétale. (N=3).

Les grades d'inflammation sont résumés dans le tableau 3. Les dommages les plus sévères sont observés à l'intérieur des lésions macroscopiques. Le TNBS engendre majoritairement une déstructuration totale du tissu, et donc une inflammation de grade IV (grade IV pour deux rats et grade II pour un rat). Dans la zone située au-dessus de la lésion, le tissu présente une inflammation moins sévère (grade 0 pour un rat et grade II pour les deux autres).

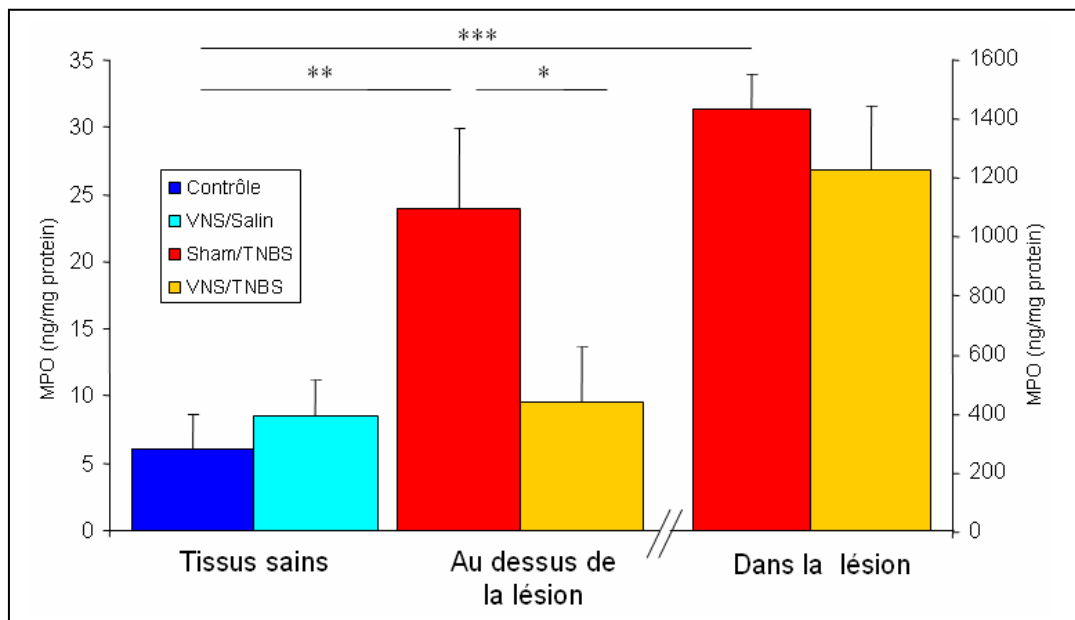
Les rats du groupe VNS/TNBS présentent des tissus avec des grades d'inflammation pratiquement aussi importants au niveau de la lésion macroscopique que le groupe Sham/TNBS, avec une importante déstructuration des tissus (grade I pour un rat et IV pour les deux autres). En revanche, au-dessus de la lésion, les grades inflammatoires sont objectivement réduits, seul un rat sur trois présente un tissu inflammatoire de grade I alors que les deux autres présentent des tissus sans aucun signe d'inflammation (grade 0).

## 2.5 Quantification de l'expression de la myéloperoxidase

Comme le montre la figure 29, les animaux des groupes recevant du sérum physiologique présentent des quantités faibles de MPO,  $6,5 \pm 2,5$  ng/mg de protéines pour le groupe contrôle et  $8,6 \pm 2,6$  ng/mg de protéines pour le groupe VNS/Salin.

L'instillation de TNBS induit des augmentations significatives de la MPO, au niveau de la lésion ainsi qu'au-dessus de la lésion, respectivement  $1426,6 \pm 119,4$  ng/mg protéines ( $p < 0.0001$ ) et  $23,9 \pm 6,0$  ng/mg protéines ( $p < 0.008$ ) en comparaison du groupe contrôle ( $6,5 \pm 2,5$  ng/mg de protéines).

La VNS induit une diminution de l'expression de la MPO dans l'ensemble du côlon. Cette diminution est uniquement une tendance au niveau de la lésion ( $1220,9 \pm 219,6$  ng/mg protéines) mais elle est significative au-dessus de la lésion où le niveau de MPO est réduit à  $9,5 \pm 4,2$  ng/mg protéines ( $p = 0,03$ ) par rapport au groupe Sham/TNBS ( $23,9 \pm 6,0$  ng/mg protéines).



**Figure 29** : expression de la MPO au niveau du côlon distal.

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ .

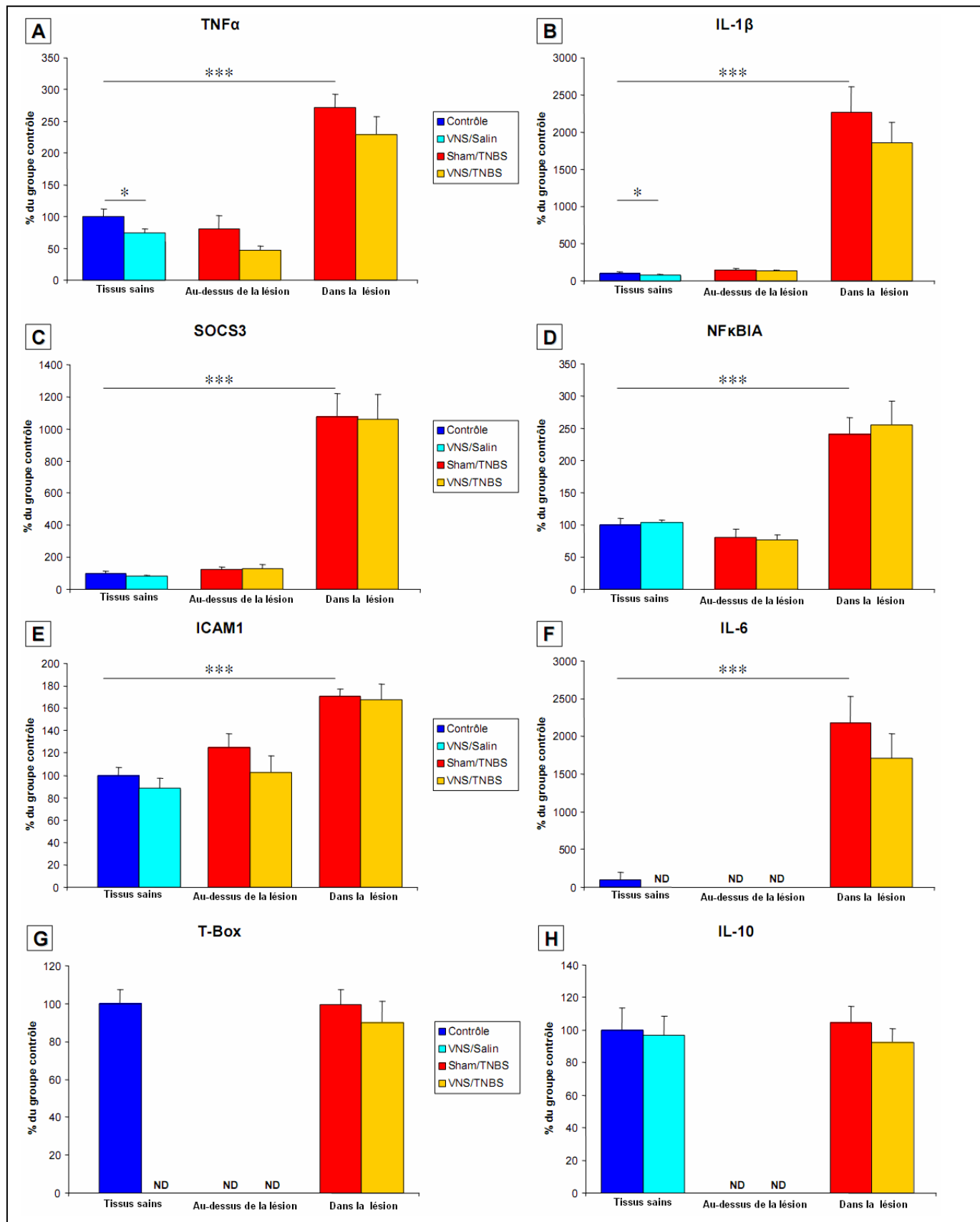
## 2.6 Dosage des ARNm

Nous avons dosé par la technique de RT-PCR plusieurs ARNm de cytokines et d'éléments associés à l'inflammation. La figure 30 présente les niveaux des ARNm ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{SOCS3}$ ,  $\text{NF}\kappa\text{BIA}$ ,  $\text{ICAM1}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{T-box 21}$ , et  $\text{IL-10}$ ) pour chacun des quatre groupes. Mise à part pour les ARNm de  $\text{T-box 21}$  et de  $\text{IL-10}$ , des augmentations significatives ( $p < 0,001$ ) de l'ensemble des autres ARNm sont observées 5 jours après l'instillation du TNBS au niveau de la lésion (figure 30A-H). Malgré de légères

fluctuations, aucune variation significative due au TNBS n'est observée au-dessus de la lésion.

Concernant l'effet de la VNS, il est intéressant de noter qu'un effet significatif a pu être observé au niveau des ARNm du  $\text{TNF}\alpha$  et de l' $\text{IL-1}\beta$ , et ce en dehors de toute inflammation. Il y a ainsi des diminutions significatives ( $p=0,01$  et  $p=0,03$  respectivement pour les ARNm du  $\text{TNF}\alpha$  et de l' $\text{IL-1}\beta$ ) de la quantité de ces deux ARNm chez le groupe VNS/Salin par rapport au groupe contrôle ( $60,3 \pm 9,3\%$  et à  $65,3 \pm 7,7\%$  respectivement pour les ARNm du  $\text{TNF}\alpha$  et de l' $\text{IL-1}\beta$ ) (figure 30 A et B).

En revanche, bien que des diminutions soient observées au niveau de la lésion (figure 30A, B, F) ou dans la zone au-dessus (figure 30A, B, D, E), aucune n'est statistiquement significative.



**Figure 30** : dosage des ARNm dans le côlon distal (exprimé en pourcentage par rapport au groupe contrôle). **A** : ARNm du TNF $\alpha$  ; **B** : ARNm de l'IL-1 $\beta$  ; **C** : ARNm de SOCS3 ; **D** : ARNm de NF $\kappa$ BIA ; **E** : ARNm de ICAM1 ; **F** : ARNm de l'IL-6 ; **G** : ARNm de T-Box 21 ; **H** : ARNm de l'IL-10. **ND** : non dosé ou non dosable. \* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

## 2.7 Index global d'inflammation

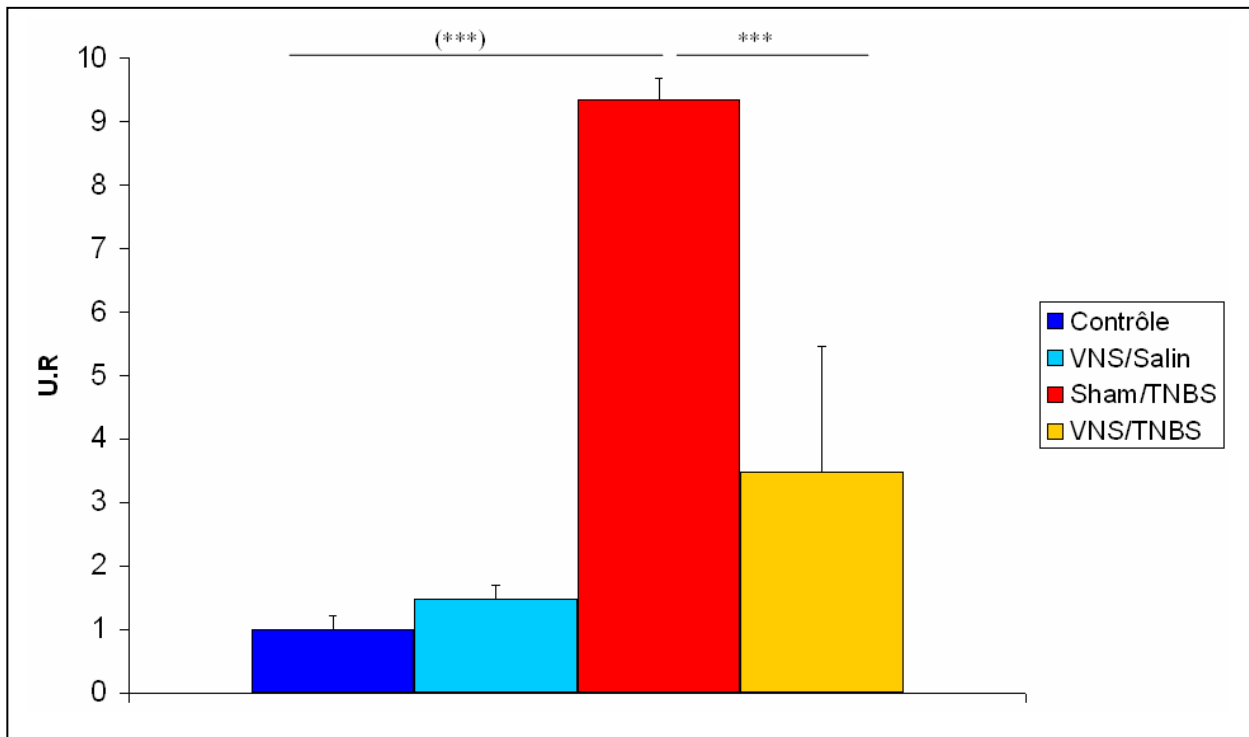
L'analyse discriminante, nous a d'abord permis de déterminer l'importance relative (coefficient standard) de chacun des paramètres étudiés dans le modèle de colite au TNBS.

|    |                                     | Coefficients standard | Coefficients non standard |
|----|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 1  | IL-6 dans la lésion                 | 4,027                 | 4,788                     |
| 2  | SOCS3 dans la lésion                | 3,622                 | -5,233                    |
| 3  | TNF $\alpha$ au-dessus de la lésion | 2,719                 | -4,487                    |
| 4  | IL-1 $\beta$ dans la lésion         | 2,201                 | 2,692                     |
| 5  | NFKBIA dans la lésion               | 2,091                 | -5,390                    |
| 6  | NFKBIA au-dessus de la lésion       | 1,820                 | 4,305                     |
| 7  | Température corporelle Jour 1       | 1,735                 | -3,950                    |
| 8  | Température corporelle Jour 2       | 1,726                 | 4,902                     |
| 9  | ICAM1 au-dessus de la lésion        | 1,641                 | 4,352                     |
| 10 | ICAM1 dans la lésion                | 1,068                 | 5,806                     |
| 11 | Moyenne de la surface des lésions   | 1,041                 | 1,139                     |
| 12 | IL-1 $\beta$ au-dessus de la lésion | 0,964                 | -1,963                    |
| 13 | SOCS3 au-dessus de la lésion        | 0,959                 | 1,253                     |
| 14 | TNF $\alpha$ dans la lésion         | 0,863                 | -2,901                    |
| 15 | TBX21 dans la lésion                | 0,569                 | 2,516                     |
| 16 | Locomotion Jour 2                   | 0,432                 | -3,095                    |
| 17 | Locomotion Jour 1                   | 0,093                 | 0,703                     |

**Tableau 4** : classement des paramètres utilisés pour l'analyse discriminante selon leur importance relative dans la colite au TNBS (coefficients standard). Les coefficients non-standard ont été utilisés pour calculer l'index global d'inflammation. **En rouge** : paramètres dosés dans lésion ; **en bleu** : paramètres dosés au-dessus de la lésion.

Dans le tableau 4, il est possible d'observer que l'importance relative des paramètres varie de 0,093 (la locomotion du jour 1) à 4,027 (ARNm de l'IL-6 dans la lésion). Il apparaît aussi que l'étude différentielle de la zone lésée et de la zone immédiatement au-dessus est intéressante, puisque parmi les six paramètres les plus importants dans la colite, deux représentent des paramètres étudiés au-dessus de la lésion (TNF $\alpha$  et NFkBIA), et les quatre autres sont des paramètres étudiés dans la lésion elle-même.

Nous avons ensuite utilisés les coefficients non-standard obtenus pour chacun des paramètres afin de calculer un index global de l'inflammation. La figure 31 représente le diagramme obtenu après le calcul de la moyenne de cet index pour chacun des groupes.



**Figure 31** : index global d'inflammation (calculé à partir des coefficient non-standard de l'analyse discriminante). **UR** : unité relative ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

L'index global d'inflammation est relativement bas pour les groupes ayant reçu une instillation du sérum physiologique :  $0,99 \pm 0,22$  UR pour le groupe contrôle (Sham/Salin) et  $1,48 \pm 0,67$  UR pour le groupe VNS/Salin.

Naturellement, avec l'instillation du TNBS et l'induction de l'inflammation, l'index global est significativement augmenté pour le groupe Sham/TNBS ( $9,35 \pm 0,34$  UR,  $p < 0,0001$  vs contrôle).

La VNS induit un net effet anti-inflammatoire, puisque, pour le groupe VNS/TNBS, l'index global d'inflammation est significativement réduit ( $3,49 \pm 1,98$  UR) par rapport au groupe Sham/TNBS ( $p < 0,001$ ).

## 2.8 Les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu

Nous avons étudié les voies intracellulaires mises en jeu par l'effet anti-inflammatoire de la VNS dans le cas de la colite induite au TNBS, pour cela nous avons tout d'abord réalisé des études par la technique de western blots.

### 2.8.1 Western blot

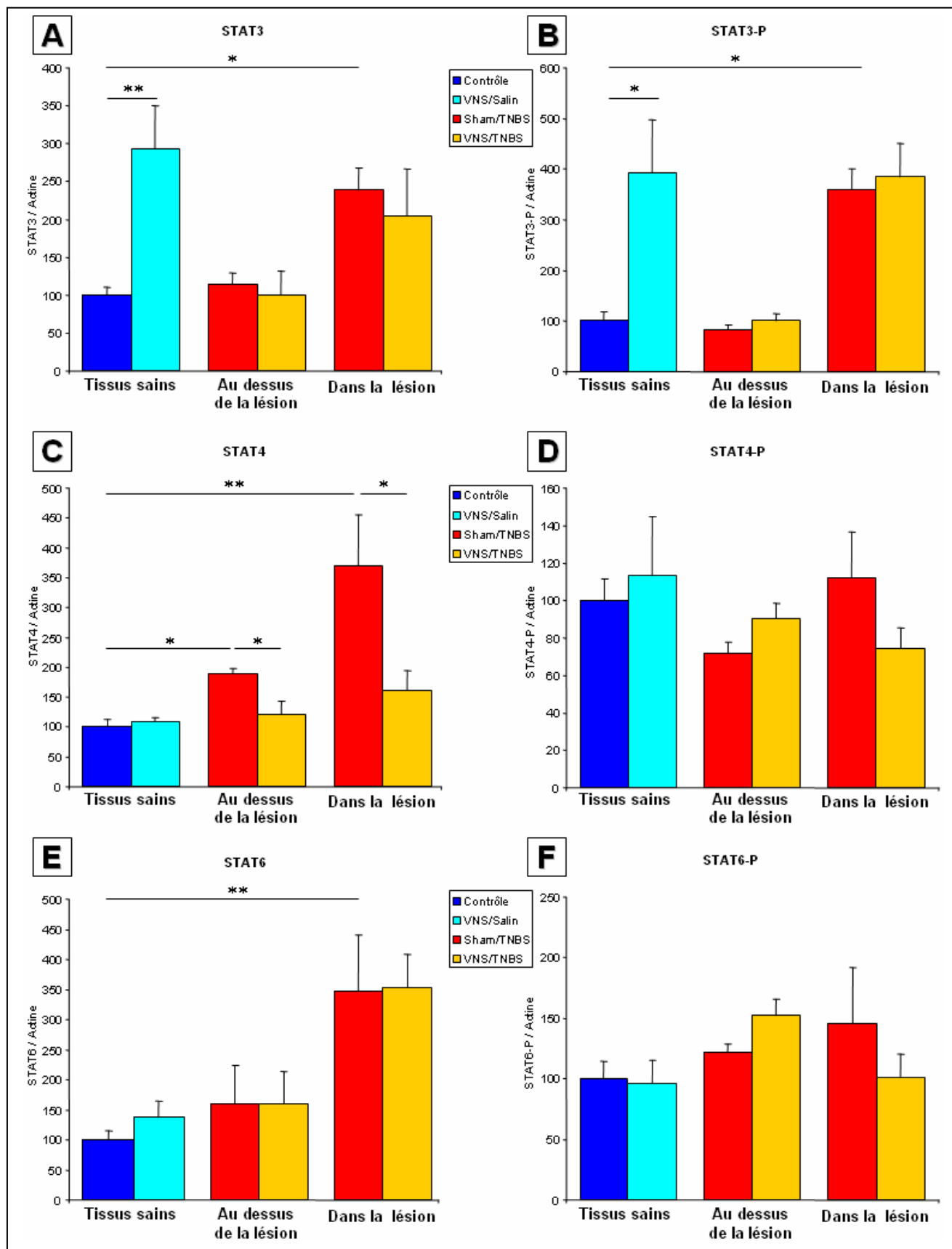
La figure 32 illustre les résultats obtenus en pourcentage de l'expression du groupe contrôle.

Le TNBS induit des augmentations significatives de STAT3 et STAT3-P au niveau de la lésion (respectivement  $237,9 \pm 30,7 \%$  et  $359,5 \pm 41,4\%$ ) par rapport au groupe contrôle ( $p=0,03$  dans les deux cas) (figure 32A et B). Aucune variation significative induite par la VNS n'est observée lorsque la colite est présente. En revanche, en l'absence de toute inflammation, la VNS augmente le niveau d'expression de STAT3 et de STAT3-P de respectivement  $292,9 \pm 56,8\%$  et  $391,9 \pm 105,2\%$  ( $p=0.004$  dans les deux cas) (figure 32A, et B).

L'instillation du TNBS entraîne des augmentations significatives de STAT4 au niveau de la lésion ( $371,0 \pm 85,1\%$ ,  $p= 0,001$ ) et au-dessus de la lésion ( $189,6 \pm 8,0\%$ ,  $P=0,01$ ) (figure 32C). Contrairement aux observations faites sur STAT3 et STAT3-P, aucune variation n'est induite par la VNS en l'absence d'inflammation.

En revanche, le niveau d'expression de STAT4 est réduit par la VNS dans la lésion ( $161,3 \pm 34,0\%$ ,  $P=0,02$ ) et au-dessus de celle-ci ( $121,8 \pm 21,5\%$ ,  $p=0,01$ ) dans le groupe VNS/TNBS (figure 32C). Sur STAT4-P, aucune variation significative n'a pu être (figure 32D).

La colite induit une augmentation significative du niveau d'expression de STAT6 dans la lésion ( $348,2 \pm 93,0\%$ ,  $P=0,001$ ) (figure 32E). Le niveau d'expression de cette protéine n'est aucunement modifié par la VNS que ce soit en présence ou non de l'inflammation. Enfin, les changements du niveau d'expression de STAT6-P observés au niveau de la lésion ou au-dessus sont, comme pour STAT4-P non significatifs, qu'ils soient dus à la colite ou à la VNS (figure 32F).



**Figure 32** : analyse par la méthode de western blot.

**A** : STAT3 ; **B** : STAT3-P ; **C** : STAT4 ; **D** : STAT4-P ; **E** : STAT6 ; **F** : STAT6-P.

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$ .

Afin de compléter les résultats obtenus par la technique de western blot sur le tissu colique total (ensemble des différentes couches épithéliales), nous avons ensuite réalisé des études immunohistochimiques.

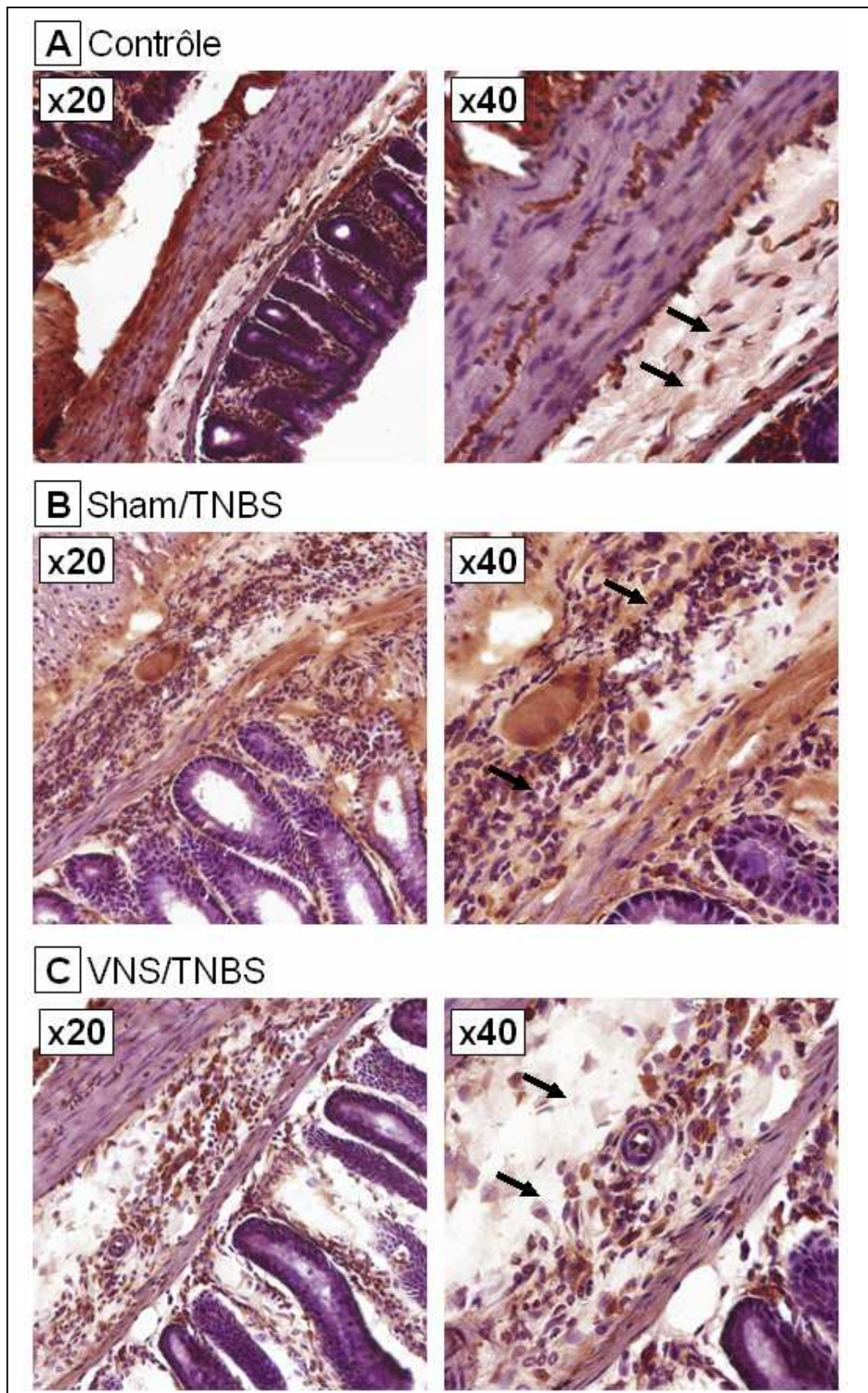
### 2.8.2 *Immunohistochimie*

Les photographies des tissus traités par méthode d'IHC (zone au-dessus de la lésion pour permettre le repérage histologique) sont présentées par la figure 33.

En dehors de toute inflammation, un nombre faible de cellules STAT4-P immunoréactives (IR) sont présentes dans le tissu, notamment au niveau de la sous-muqueuse (figure 33A).

Au contraire, dans le cas de l'inflammation digestive, un grand nombre de cellules STAT4-P IR apparaissent dans le tissu colique (figure 33B).

Dans le cas des côlons issus des rats du groupe VNS/TNBS, il semble que les cellules STAT4-P IR soient moins nombreuses, notamment dans la sous muqueuse (figure 33C). En revanche, peu de changements ont été observés dans le cas du marquage STAT6-P (données non exposées).



**Figure 33** : analyse par l'IHC de STAT4-P au-dessus de la lésion. **A** : dans le tissu contrôle ; **B** : dans le tissu Sham/TNBS ; **C** : dans le tissu VNS/TNBS. Grossissement d'observation x20 à gauche et x40 à droite. Flèches : marquages dans la sous-muqueuse

### 3 *Discussion*

Les expériences réalisées montrent pour la première fois un effet de la VNS sur l'inflammation induite dans modèle expérimental de colite. L'originalité de cette étude est d'avoir été réalisée sur des rats vigils implantés chroniquement avec l'électrode de stimulation vagale. Les résultats obtenus sont en faveur d'un effet anti-inflammatoire de la VNS sur la colite au TNBS.

Le rôle du SNA dans la régulation de l'inflammation et plus précisément de l'inflammation intestinale a été mis en évidence dès les années 50 chez des patients atteints de MICI (Dennis *et al.*, 1946; Thoreck, 1951). Il existe en effet une dysautonomie vagale et sympathique chez les patients atteints de MICI (Sharma *et al.*, 2009). De plus, des expériences ont montré qu'une colite expérimentale induite au TNBS pouvait être améliorée par sympathectomie (McCafferty *et al.*, 1997) ou aggravée par vagotomie (Mazelin *et al.*, 1999).

Le nerf vague a une double propriété anti-inflammatoire :

- d'une part via ses afférences, qui, peuvent induire l'activation de l'axe corticotrope (Gaykema *et al.*, 1995; Kapcala *et al.*, 1996).
- d'autre part, via ses efférences et la voie cholinergique anti-inflammatoire, dans ce cas, les voies exactes mises en ne sont pas déterminées avec exactitude (The *et al.*, 2007; Van Der Zanden *et al.*, 2009a).

La VNS est aujourd'hui une thérapie approuvée dans le traitement de certaines formes d'épilepsies et de dépressions pharmaco-résistantes (Groves & Brown, 2005). Dans ce type d'indication, la VNS a pour but la stimulation des afférences vagales par l'intermédiaire d'impulsions électriques de « hautes fréquences » (20-30Hz). En revanche, la stimulation électrique des efférences vagales a été obtenue expérimentalement en utilisant des stimulations de plus basses fréquences (entre 1 et 10Hz) (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Bernik *et al.*, 2002b). Toutes les études réalisées sur la voie cholinergique anti-inflammatoire ont été faites dans des conditions aiguës, c'est-à-dire sur des rats anesthésiés, et de manière non répétée (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Bernik *et al.*, 2002b; de Jonge *et al.*, 2005; The *et al.*, 2007) avec le plus souvent un nerf vague sectionné, ligaturé et avec une électrode implantée sur la partie distale du nerf

vague afin de ne stimuler que les efférences (Borovikova *et al.*, 2000b; de Jonge *et al.*, 2005).

Dans le cas de notre étude, nous avons choisi de nous placer dans des conditions de VNS itératives, c'est-à-dire sur des rats non anesthésiés et implantés chroniquement avec l'électrode de stimulation afin de pouvoir réaliser plusieurs cycles de stimulation et ainsi étudier l'effet anti-inflammatoire sur une colite expérimentale. Ce choix de protocole expérimental était lié aux conditions de stimulation potentiellement applicables chez l'Homme. C'est aussi pour cette raison que nous n'avons pas réalisé de vagotomie. Nous nous sommes donc placés dans le cas d'une colite aiguë, provoquée par l'instillation de TNBS (à induction rapide) avec l'électrode implantée au niveau de la portion cervicale du nerf vague gauche intact.

Le choix des conditions de stimulation a été réalisé après une étude bibliographique. Nous avons tout d'abord opté pour une implantation au niveau du nerf vague dans sa portion cervicale, région anatomique facilement accessible et déjà utilisée dans de précédentes études (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002b; Krahel *et al.*, 2004; Follesa *et al.*, 2007). L'électrode a été placée au niveau du nerf vague gauche puisque, la bibliographie et des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire, ont montré que la stimulation de celui-ci avait des effets cardiovasculaires réduits par rapport à la stimulation du nerf vague droit. Nous avons opté pour des paramètres de stimulation (fréquence et intensité) couramment utilisés pour activer les efférences et la voie cholinergique anti-inflammatoire : 5Hz, 1mA, 500µs, 10sec ON, 90sec OFF (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Bernik *et al.*, 2002b; The *et al.*, 2007). Concernant la durée de stimulation, nous avons fait le choix d'une stimulation de 3h par jour durant 5 jours en fonction des données bibliographiques : Naritoku *et al.* avait déjà effectué des stimulations de 3h (Naritoku *et al.*, 1995), l'étude de Miceli *et al.* montrait quant à elle l'effet à 5 jours de l'injection d'agonistes cholinergiques sur la colite au TNBS (Miceli & Jacobson, 2003). Il est aussi important de souligner que la période de 5 jours représente le délai nécessaire pour induire une réponse inflammatoire aiguë avec inflammation trans pariétale (Morris *et al.*, 1989; Miceli & Jacobson, 2003; Alex *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2008).

Concernant le modèle de colite au TNBS, nous nous sommes basés sur le modèle introduit par Morris en 1989 (Morris *et al.*, 1989) et validé dans notre laboratoire (Porcher

*et al.*, 2004; Sinniger *et al.*, 2005). Nous avons choisi la dose minimale pour induire une colite selon Morris, c'est-à-dire : 10mg/kg. Cet choix a été réalisé de manière à réduire les lésions au niveau du côlon, en supposant que l'effet de la VNS serait limité sur des lésions et des déstructurations du tissu trop importantes. La diminution de la dose de TNBS nous a également permis de réduire le taux de mortalité des rats, qui aurait été important du fait de la fragilisation des animaux ayant déjà subi au préalable l'implantation chirurgicale.

Par similitude aux MICI chez l'Homme (Silk & Payne-James, 1989; Rigaud *et al.*, 1994), la colite au TNBS induit une sévère perte de poids due notamment à la réduction de la prise alimentaire (McHugh *et al.*, 1994; Ballinger *et al.*, 2000). Dans de précédentes études, une perte de poids de 12% au 5<sup>ème</sup> jour a été rapportée (Ballinger *et al.*, 2000) et dans l'étude de Morris (Morris *et al.*, 1989) une diminution de 8 à 10% a été observée durant la première semaine suivant l'instillation. Dans notre étude, une perte d'environ 4% du poids initial est observée, ce qui est en adéquation avec les précédentes études en raison de la dose de TNBS plus faible utilisée. La VNS a un effet bénéfique sur la perte de poids des animaux induite par la colite. Chez les animaux stimulés, la perte est quasiment annulée, puisque les animaux ont une perte pondérale de 0,3% par rapport au moment de l'injection, soit plus de dix fois moins que le groupe non stimulé.

Le TNBS induit une inflammation colique provoquant de sévères lésions trans pariétales au niveau du côlon distal. Les lésions ont été observées entre 3 et 7cm au-dessus de l'anus comme cela a déjà été décrit précédemment (Morris *et al.*, 1989; Miceli & Jacobson, 2003; Porcher *et al.*, 2004). Dans notre étude nous avons considéré deux zones tissulaires : la première étant la zone dite « lésée » du côlon, comportant de sévères lésions et nécroses macroscopiques, la deuxième étant la zone située juste au-dessus de celle-ci, sans lésion macroscopique apparente mais avec tout de même un œdème tissulaire visible (épaississement tissulaire) dû à l'infiltration de cellules immunitaires. Cette deuxième zone, moins sévèrement touchée pourrait être comparée à la zone de pénombre induite lors des ischémies et qui a une importance fondamentale dans la gravité et l'étendue des lésions tissulaires (Astrup *et al.*, 1981; Baron, 2001).

Les analyses anatomopathologiques qualitatives réalisées dans les deux zones tissulaires montrent des résultats similaires aux études précédentes utilisant du TNBS (Morris *et al.*, 1989; Miceli & Jacobson, 2003), c'est-à-dire des signes évidents d'inflammation avec infiltration de cellules immunitaires, une vasodilatation ainsi que

d'importants signes de déstructuration au niveau de la zone lésée. Au contraire, aucune lésion n'a pu être observée chez les animaux recevant une instillation de sérum physiologique. L'étude histologique montre que la VNS n'a que peu d'effet au niveau de la zone lésée, par contre celle-ci a un effet bénéfique au-dessus de la zone lésée, avec une réduction de l'infiltrat cellulaire et globalement du grade inflammatoire. Il apparaît donc que la VNS a un effet visible dans la zone non lésée, c'est-à-dire au niveau du tissu non déstructuré. Le modèle de colite au TNBS induisant malgré tout de sévères lésions tissulaires, il est dès lors possible que de meilleurs résultats aient pu être obtenus grâce à la VNS sur une colite moins agressive (comme celle induite par le DSS). Ces résultats sont à mettre en corrélation avec une récente étude de l'effet de la VNS sur l'inflammation digestive modérée induite dans un modèle d'iléus post-opératoire (The *et al.*, 2007). Celle-ci montre que la VNS apporte d'importantes améliorations des paramètres étudiés notamment une diminution des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-6.

De précédents travaux ont mis en évidence d'importantes augmentations de l'expression colique de la MPO, sans distinction des différentes zones du côlon selon leur état lésionnel (Miceli & Jacobson, 2003; Ghia *et al.*, 2007). Dans notre cas, une augmentation importante (200 fois supérieure) de l'expression de la MPO est observée au niveau de la zone lésée, ainsi qu'une augmentation plus modérée au niveau de la zone non lésée (4 fois supérieure). Il semble donc que la distinction entre les deux zones coliques ait un intérêt puisque l'une reflète une inflammation très sévère avec déstructuration tissulaire (zone lésée) alors que l'autre reflète une inflammation plus modérée. Concernant l'effet de la VNS, il en résulte dans les deux cas une réduction de la MPO, mais uniquement de manière significative au-dessus de la lésion, c'est-à-dire là encore en dehors de la zone déstructurée. Ces résultats sont en corrélation avec la diminution par la VNS des signes d'inflammation observés dans l'analyse histologique. La VNS semble donc avoir plus d'effet sur l'inflammation modérée, il paraît cependant cohérent de se demander si une zone avec de très sévères lésions demeure à la portée d'un quelconque effet thérapeutique.

Enfin, il est important de préciser que dans notre étude nous avons réalisé une stimulation de 3h par jour durant 5 jours consécutifs. Il est donc possible que des effets bénéfiques plus importants aient pu être induits par une plus grande durée journalière de stimulation, voire même par une stimulation continue ou encore par une augmentation du délai entre le début de la stimulation et l'induction de la colite. En effet, nous avons choisi

de commencer la stimulation 1h avant l'instillation mais dans la plupart des études la VNS débute à des temps variés avant l'induction de l'inflammation (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Bernik *et al.*, 2002b; de Jonge *et al.*, 2005). Il serait peut-être intéressant d'étudier les effets d'une stimulation débutée plusieurs jours avant l'induction de la colite. En effet, par analogie avec le traitement de l'épilepsie chez l'Homme où la stimulation est continue, il serait envisageable de stimuler de manière préventive afin de maintenir l'état de rémission chez le patient (hypothèse corrélée par les effets de la VNS sur le TNF $\alpha$  colique en l'absence d'inflammation).

L'inflammation intestinale induite par le TNBS est caractérisée par des perturbations importantes des rythmes circadiens de température corporelle et d'activité locomotrice (Boisse *et al.*, 2003). Nous observons, en effet, une hypothermie corrélée avec une diminution de l'activité locomotrice visible durant les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> périodes actives (phases d'obscurité) suivant l'instillation. Cependant, aucune étude n'a pu corréliser ces perturbations, hypothétiquement attribuées à l'augmentation des cytokines comme le TNF $\alpha$  ou l'IL-6 dont les augmentations n'ont pu être détectées qu'au niveau du tissu colique (Ghia *et al.*, 2006) et non au niveau systémique (Boisse *et al.*, 2003). Sur ces paramètres physiologiques de température et de locomotion, la VNS n'améliore pas significativement les altérations induites par le TNBS : la diminution d'activité locomotrice et les altérations de température corporelle demeurent dans le groupe stimulé. A ce niveau encore, le modèle de colite au TNBS engendre d'importantes modifications de ces paramètres qu'il est difficile de contrebalancer.

Lorsqu'on s'intéresse à l'inflammation, la concentration des cytokines a naturellement une grande importance. La majorité des études quantifie ces cytokines, au niveau plasmatique ou au niveau tissulaire par l'intermédiaire de dosages ELISA (Tateishi *et al.*, 1997; Ghia *et al.*, 2007, 2008). Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés aux ARNm de cytokines et de marqueurs inflammatoires par l'intermédiaire de la RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction), technique plus sensible visant à mesurer la quantité des ARNm. Nous avons donc mesuré la quantité d'ARNm de cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) et de marqueurs d'inflammation (ICAM1, SOCS3, T-box 21, NF $\kappa$ BIA) au sein du tissu colique. Des augmentations d'ARNm de cytokines ont pu être détectées. Nous avons ainsi mis en évidence des augmentations significatives de la majorité des ARNm étudiés cinq jours après l'instillation du TNBS, notamment du TNF $\alpha$  et de l'IL-6

contrairement à l'étude ELISA de Tateishi *et al.* (Tateishi *et al.*, 1997) qui ne parvenait à détecter des changements de l'expressions des cytokines elles-mêmes, uniquement à des temps plus proches de l'instillation : maximum à 45 min pour le TNF $\alpha$  et à 6h pour l'IL-1 $\beta$ . Concernant les effets de la VNS, bien qu'une tendance à la diminution soit visible pour la majorité des ARNm (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, T-box 21), aucune réduction significative n'est observée suite à l'étude statistique des paramètres isolés. Il est toutefois possible que la VNS ait eu des effets plus importants à des temps plus précoces de l'inflammation, c'est-à-dire au moment des concentration maximale de cytokines, durant les heures suivant l'instillation du TNBS. Le dosage des cytokines et de leurs ARNm à des temps plus précoces fait actuellement l'objet d'une étude dans notre laboratoire.

Cependant, considérant que les différentes cytokines forment un réseau complexe et agissent ensemble de manière synergique ou au contraire antagoniste, il apparaît intéressant d'étudier le phénomène inflammatoire dans son ensemble. En effet, l'inflammation est un phénomène complexe mettant en jeu de multiples niveaux de réponses biologiques face au stress afin de parvenir au contre-balancement de l'inflammation, à la réparation des lésions tissulaires et dans la mesure du possible en évitant une hyper-activation du système immunitaire. Pour cette raison, nous avons étudié la réponse inflammatoire induite par le TNBS par l'intermédiaire d'un index global prenant en compte différents marqueurs d'inflammation moléculaires, tissulaires et physiologiques (Vodovotz *et al.*, 2008; Vodovotz *et al.*, 2009). Pour cela, nous avons appliqué une analyse discriminante multivariée sur différents paramètres (moléculaires, tissulaires et intégré) dans le cas de la colite en comparant dans un premier temps le groupe contrôle au groupe Sham/TNBS. Nous avons ainsi obtenu par cette analyse un coefficient reflétant l'importance de chacun des paramètres dans le cas de la colite au TNBS et nous avons pu calculer l'index global de l'inflammation pour les quatre groupes.

L'index global d'inflammation est naturellement augmenté avec la colite au TNBS. Concernant les effets de la VNS, il y a une amélioration significative de l'index global pour le groupe stimulé dont la valeur est divisée par 3 par rapport au groupe non stimulé. Cela montre que la VNS a un effet bénéfique global sur l'inflammation induite par la colite. Nous pouvons aussi remarquer que parmi les 6 premiers paramètres, le tiers des paramètres correspond à des dosages effectués au-dessus de la zone lésée, ce qui souligne l'importance de considérer cette zone dans l'étude de la colite au TNBS. De plus les deux

paramètres les plus importants selon l'analyse discriminante sont les ARNm de l'IL-6 et de SOCS3. Cette observation est en corrélation avec une précédente étude qui a montré que SOCS3 joue un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation dépendante de l'IL-6 (Alexander & Hilton, 2004).

La colite au TNBS induit une réponse inflammatoire digestive présentant des homologues avec la maladie de Crohn, c'est-à-dire un déséquilibre de la balance Th1-Th17/Th2 en faveur des Th1-Th17 (Alex *et al.*, 2008). La VNS avait précédemment montré son effet bénéfique dans plusieurs modèles d'inflammation notamment par la diminution de l'expression du TNF $\alpha$  induite dans un modèle d'inflammation systémique (Borovikova *et al.*, 2000b; Bernik *et al.*, 2002a; Bernik *et al.*, 2002b). Notre étude montre elle aussi que la VNS a un effet bénéfique sur la colite au TNBS. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier les voies mises en jeu dans la modulation de la colite au TNBS. Nous avons donc choisi d'étudier plusieurs marqueurs de différenciation immunitaire :

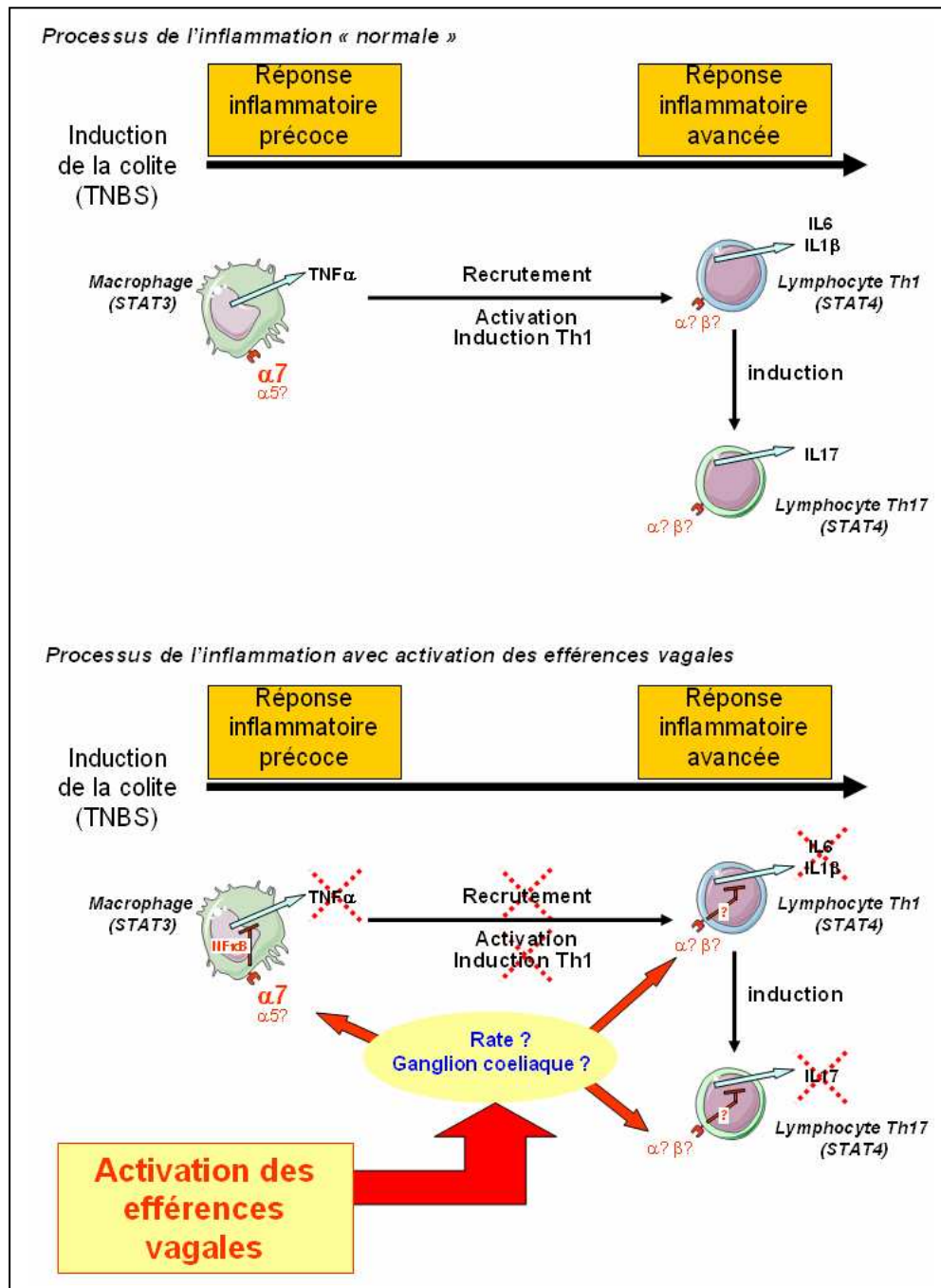
- STAT3/STAT3-P, marqueur d'activation du macrophage sur lequel les effets de la VNS ont déjà été montrés dans le cas d'un modèle d'iléus post opératoire (The *et al.*, 2007). Dans cette étude, la VNS induisait une augmentation de l'expression de STAT3 par les macrophages,
- STAT4/STAT4-P et STAT6/STAT6-P qui sont respectivement des marqueurs lymphocytaires Th1/Th17 (Pang *et al.*, 2007; O'Malley *et al.*, 2008) et Th2 (Wurster *et al.*, 2000). Ces dosages nous ont semblé intéressants dans un modèle de colite induisant un déséquilibre Th1-Th17/Th2 (Alex *et al.*, 2008) et dans lequel l'activation de STAT4 a déjà été montrée (Coccia *et al.*, 2005).

Notre étude concernant ces marqueurs d'activation de voies intracellulaires montre des activations de la voie STAT3/STAT3-P par la VNS à l'état basal en corrélation avec l'étude de The (The *et al.*, 2007) qui avait observé que la nicotine activait cette voie dans les macrophages péritonéaux. Dans le cas de l'inflammation digestive induite par le TNBS cette activation n'est plus visible 5 jours après l'instillation. Cette observation est en accord avec les augmentations des ARNm de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ , éléments dont l'expression est inhibée par STAT3. Nous pouvons malgré tout nous demander si l'augmentation de STAT3 a eu lieu à des temps précoces ou si l'activation est masquée par l'effet de l'inflammation.

Ces données sont cohérentes avec les résultats de RT-PCR concernant l'ARNm du TNF $\alpha$  dont le niveau est abaissé par la VNS en l'absence de toute inflammation. Il semble donc que dans notre modèle aussi la VNS ait une action sur le macrophage (Borovikova *et al.*, 2000b; Tracey, 2002, 2007) et plus précisément sur la voie STAT3/STAT3-P (The *et al.*, 2007). Notre étude montre aussi que la VNS a un effet sur les lymphocytes T, puisque une variation des niveaux de STAT4, principalement présente dans les lymphocytes Th1 et Th17 (Alex *et al.*, 2008; O'Malley *et al.*, 2008) est induite par la VNS. La diminution des niveaux de STAT4 dans la lésion et au-dessus de celle-ci indique en effet que la VNS ait induit une diminution des lymphocytes Th1 et Th17, contrebalançant ainsi les changements dans la balance Th1-Th17/Th2 dus au TNBS. La VNS a donc, au final, un effet bénéfique sur le déséquilibre Th1-Th17/Th2 induit par le TNBS.

Cette étude ne permet néanmoins pas de conclure en ce qui concerne le mode d'influence de la VNS sur les lymphocytes. Dès lors, deux hypothèses peuvent être proposées :

- soit la VNS a un mode d'action direct sur les lymphocytes. En effet ceux-ci expriment plusieurs éléments du système cholinergique (Kawashima *et al.*, 2007)
- soit au moment précoce de l'inflammation la VNS, a agit, par la voie classique, sur les macrophages et la modulation de ceux-ci a permis au final la diminution du niveau de Th1/Th17 dans le tissu colique (figure 34).



**Figure 34** : mécanismes d'action possibles de la VNS dans le cas de l'inflammation colique.

Il est enfin possible que ces deux modes d'action aient eu lieu. Dans ce cas la VNS aurait la propriété d'agir à la fois au moment précoce de l'inflammation sur le macrophage et à temps plus tardif de l'inflammation sur les lymphocytes. Des travaux complémentaires notamment de caractérisation des cellules immunitaires seront nécessaires pour connaître ce qu'il en est réellement.

## **2<sup>ème</sup> Partie : Effets latéraux de l'électrostimulation vagale**

# Etude des effets latéraux de l'électrostimulation vagale

## 1 *But de l'étude*

Cette étude avait pour objectif d'explorer les effets potentiels provoqués par la VNS au niveau du SNC et au niveau périphérique. En effet, même si de précédentes études ont montré que les paramètres de stimulation utilisés (basses fréquences) ne semblaient avoir un effet anti-inflammatoire que par l'intermédiaire des afférences vagales, nous avons voulu vérifier si une activation du SNC, et plus précisément du NTS où arrivent les afférences vagales, était induite dans notre cas. D'autre part, en raison du rôle moteur du nerf vague, il est possible que la VNS entraîne une modification de la contraction des organes du tractus digestif recevant des fibres vagales.

La première partie de cette étude a donc été consacrée à l'exploration des effets centraux de la VNS par l'IHC du *c-fos* (marqueur d'activation neuronale).

Dans la deuxième partie, la contraction des muscles lisses de l'intestin grêle a été enregistrée afin de savoir si la VNS était à l'origine d'une modification de la motricité digestive par étude des complexes moteurs migrants (CMM).

## 2 *Effet de l'électrostimulation vagale sur le système nerveux central*

L'exploration des effets centraux de la VNS a fait l'objet de nombreuses études que ce soit *in vivo* (Sucholeiki *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Dedeurwaerdere *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2008) ou *in situ* (Naritoku *et al.*, 1995; Bohotin *et al.*, 2003; Osharina *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2008). Plusieurs types d'études *in vivo* (IRMf, PET) ont été utilisés pour étudier les effets de différents types de VNS chez l'Homme (Sucholeiki *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2008) mais aussi chez le rat (Dedeurwaerdere *et al.*, 2005). Toutes ces études montrent que plusieurs régions du SNC sont concernées par la VNS (thalamus, hypothalamus,

hippocampe notamment). Cependant, toutes ne sont pas en accord concernant la manière dont sont affectées ces régions, c'est-à-dire si des activations ou, au contraire, des désactivations sont entraînées par la VNS (Chae *et al.*, 2003). Il faut aussi souligner que l'ensemble de ces études, mise à part celle de Osharina *et al.* (2006), portent sur l'effet central de VNS aux paramètres proches de ceux utilisés dans le traitement de l'épilepsie (30Hz). Au final, la seule étude portant sur les effets centraux d'une VNS basse fréquence, est celle de Osharina *et al.* ; dans cette étude, les deux fréquences de stimulation utilisés (1Hz et à 10Hz) sont malgré tout différentes de la notre (5Hz). Les résultats de cette étude montrent un effet différent en fonction de la fréquence de stimulation sur l'activation neuronale au niveau du NTS : pas de changement dans l'expression du *c-fos* avec la VNS à 1Hz, au contraire, augmentation de l'expression du *c-fos* avec la stimulation à 10Hz (Osharina *et al.*, 2006). La fréquence est donc bien un paramètre qui entre en jeu dans l'induction des différents effets de la VNS.

Il nous a donc semblé important d'étudier quels étaient les effets de notre stimulation sur le SNC, puisque aucune autre étude n'utilise de tels paramètres. Pour cela deux expérimentations ont été menées, la première est une exploration utilisant la technique d'IRMf. Les résultats de celle-ci sont actuellement en cours de traitement. La seconde est une étude de l'activation neuronale du NTS par IHC du *c-fos*, facteur de transcription et marqueur d'activation neuronale, technique validée dans le laboratoire (Sinniger *et al.*, 2005) et déjà utilisé dans le cadre de la VNS (Naritoku *et al.*, 1995; Bohotin *et al.*, 2003; Osharina *et al.*, 2006; Cunningham *et al.*, 2008). Nous nous sommes donc appuyés sur les protocoles déjà utilisés pour caractériser les effets de nos paramètres de stimulation.

## **2.1 Matériel et méthode**

### **2.1.1 Animaux**

L'expérimentation a été réalisée sur 14 rats mâles Spragues-Dawley de 250-300g (Janvier, Le Genest St Isle, France). Ils ont été hébergés dans des conditions de stabulation

identiques à celles de l'étude principale. Les animaux ont là aussi été acclimatés durant au minimum 7 jours avant toute manipulation.

Quatre groupes d'animaux ont été utilisés :

- Témoins : uniquement anesthésiés, 2 animaux,
- Sham : implantés avec l'électrode de stimulation mais non stimulés, 3 animaux,
- VNS 30 : stimulés avec une fréquence de 30Hz, 7 animaux,
- VNS 5 : stimulés avec une fréquence de 5Hz. 2 animaux.

### **2.1.2 Chirurgie**

La chirurgie d'implantation a été effectuée sur des rats anesthésiés par injection intrapéritonéale (IP) de Pentobarbital® (60mg/kg, CEVA santé animale, Libourne, France) selon la même technique que celle utilisée dans l'étude principale. L'électrode a été placée sur le nerf vague et directement reliée au dispositif de stimulation.

### **2.1.3 Stimulation vagale**

L'électrostimulation a été réalisée de manière aiguë durant 3h avec des paramètres identiques à ceux utilisés dans l'étude de l'effet anti-inflammatoire (1mA, 500µs, 10s ON, 90s OFF). Toutefois, deux fréquences de stimulation ont été utilisées : 5Hz et 30Hz. Les rats ont été maintenus anesthésiés par l'intermédiaire d'injections répétées de pentobarbital® (30mg/kg, IP) durant toute la durée de la VNS.

### **2.1.4 Euthanasie et prélèvements.**

Au terme des 3h de stimulation, les animaux ont été sacrifiés par perfusion intracardiaque de sérum physiologique puis de paraformaldéhyde (PFA, 4%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Le cerveau a ensuite été prélevé puis post-fixé dans la même solution de PFA durant 24h. Après cela, le tissu nerveux a été plongé dans une solution de sucrose 30% (Sigma-Aldrich) durant 3 jours à la suite desquels, le tissu a été congelé dans la carboglace. Des coupes de 30µm ont ensuite été réalisées au cryostat (Microm HM500M), puis déposées dans une solution d'antigel jusqu'à l'IHC.

### 2.1.5 Immunohistochimie.

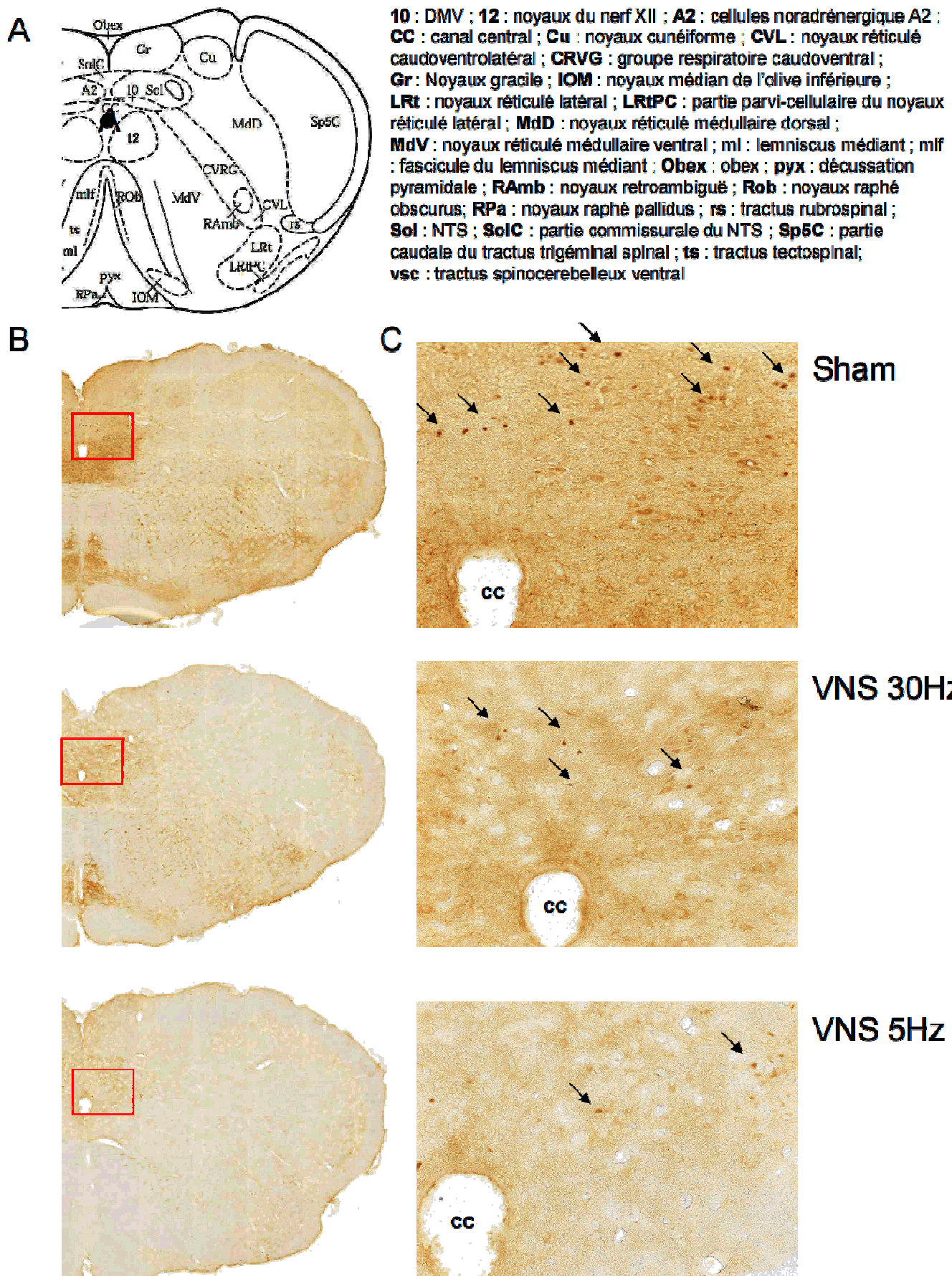
Une IHC sur coupes flottantes a été réalisée (Sinniger *et al.*, 2005). Pour cela les coupes de cerveau ont d'abord subi un rinçage dans une solution de PBS, puis une incubation dans l'eau oxygénée 3% a été effectuée afin d'inhiber la peroxydase endogène. Après une incubation de 30min dans une solution de saturation : 0.5% de triton (Euromedex, Souffelweyersheim, France) 10% de sérum de chèvre (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ; l'incubation avec l'anticorps primaire (PC38, Merck, Nottingham, UK) a été effectuée durant 1h. Ensuite, l'incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé (anti-lapin, Sigma-Aldrich) a précédé l'incubation dans la solution avidine/biotine (ABC, Vector Laboratories). Pour finir, l'étape de coloration a été réalisée dans la solution de peroxydase (DAB, Vector Laboratories) durant quelques minutes. Les tissus ont ensuite été déposés sur lame. Après dégraissage et déshydratation, une lamelle a été fixée par du DPX (VWR).

### 2.1.6 Examen des lames.

L'observation (grossissement x20) et les prises de vue des lames ont été effectuées au microscope (Axioskop, Carl Zeiss). Un comptage du nombre de cellules positivement marquées a été effectué bilatéralement au niveau du NTS dans les coupes de cerveau comprises dans les plans situés entre 13,68 et 14,60mm en arrière du bregma de l'atlas anatomique (Paxinos & Watson, 1997).

## 2.2 Résultats

La figure 35 montre les photographies des tissus après IHC. Le marquage positif apparaît notamment au niveau du NTS.



**Figure 35** : photographies de l'IHC du *c-fos*. **A** : zones anatomiques de la coupe ; **B** : hémis-cerveau ; **C** : zoom au niveau du NTS. Grossissement d'observation x20.

Les résultats de l'évaluation de l'activation neuronale au niveau du NTS sont présentés dans le tableau 5.

Chez les témoins une activation neuronale quasiment nulle a été obtenue (0,7 RU). En revanche, une activation est induite dans le groupe Sham, (21.2 RU) et dans le groupe VNS 30 (15,2 RU). Enfin une activation neuronale faible (6,8 RU) est présente dans le groupe VNS 5.

| Groupe | Nbre de rats | Activation NTS (RU) |
|--------|--------------|---------------------|
| Témoin | 2            | 0,7 ± 0,5           |
| Sham   | 3            | 21,2 ± 5,0          |
| VNS 30 | 7            | 15,2 ± 2,0          |
| VNS 5  | 2            | 6,8 ± 2,5           |

**Tableau 5** : activation neuronale au niveau du NTS.

## 2.3 Discussion

Bien que les effectifs soient trop peu élevés dans la plupart des groupes, cette expérience permet cependant de voir les tendances de l'activation neuronale. Ainsi, contrairement à ce qui avait été décrit dans l'expérience de Naritoku (Naritoku *et al.*, 1995), nous obtenons ici une activation neuronale induite au niveau du NTS avec l'implantation chirurgicale de l'électrode. De plus la stimulation à la fréquence de 30Hz provoque non pas une augmentation, mais au contraire une légère diminution du marquage *c-fos* par rapport aux rats du groupe Sham. En ce qui concerne la stimulation à 5Hz, là encore on observe une diminution du nombre de cellules positives au marquage *c-fos* que ce soit par rapport au groupe VNS 30 ou au groupe Sham. Ces résultats ne peuvent que difficilement être comparés avec des résultats déjà publiés, puisque les fréquences de stimulation diffèrent. Cependant, l'une des études (Osharina *et al.*, 2006) a malgré tout utilisé deux basses fréquences de stimulation (1 et 10 Hz) et a ainsi montré qu'aucune augmentation du *c-fos* n'était observée à 1Hz, alors qu'à 10Hz une activation a été induite au niveau du NTS. Il semble donc que des effets différents puissent être obtenus grâce à des variations de la fréquence de stimulation. De plus il faut souligner que dans cette expérience, nous avons réalisé une stimulation aiguë. Les rats ont en effet été stimulés

durant une période unique de 3h, et non de manière répétée comme ce fut le cas dans notre étude principale. Or il a été montré récemment que le temps de stimulation est lui aussi un paramètre qui joue un rôle au niveau des effets de l'activation neuronale centrale (Cunningham *et al.*, 2008). Dans cette étude, la VNS chronique (3 semaines) induit une expression de *c-fos* dans certains noyaux (notamment le cortex cingulaire) qui n'est pas observée avec la stimulation aiguë (2h). Il est donc possible que l'effet central de la VNS observé durant cette expérience soit différent de celui obtenu lors de notre étude principale. Il sera donc nécessaire de réaliser une quantification de l'activation neuronale directement sur les cerveaux issus des rats de l'étude principale pour connaître quels sont les impacts de la VNS répétée sur le SNC.

### 3 *Effet de l'électrostimulation vagale sur la motricité digestive*

Le nerf vague a un rôle non seulement dans la modulation des sécrétions gastriques (Lefebvre *et al.*, 1978; Gue *et al.*, 1987) mais aussi dans le contrôle de la motricité gastro-intestinale (Hall *et al.*, 1983). Dans cette étude, nous avons donc choisi d'étudier les effets latéraux de la VNS sur la motricité de l'intestin grêle (Bonaz *et al.*, 1991; Pellissier *et al.*, 1996). Chez le rat à jeun, comme chez l'Homme, la motricité digestive au niveau de l'intestin grêle est organisée en complexes moteurs migrants (CMM) (Ruckebusch & Laplace, 1967; Code & Marlett, 1975). Chacune de ces contractions péristaltiques a pour but de pousser le reste du contenu luminal vers le côlon. Les CMM commencent à l'estomac et se propagent donc tout le long de l'intestin grêle. Ils sont constitués de 3 phases :

- la phase I : phase de repos, peu d'activité contractile avec uniquement des ondes lentes,
- la phase II : phase d'activité irrégulière, avec des potentiels d'action et des contractions localisées présents en plus des ondes lentes,
- la phase III : phase d'activité intense et régulière provoquant un train de contraction (Ader *et al.*, 2006).

#### 3.1 **Matériel et méthode**

##### 3.1.1 *Animaux*

L'expérimentation a été réalisée sur cinq rats mâles Spragues-Dawley de 250-300g (Janvier, Le Genest St Isle, France). Ils ont été hébergés dans des conditions de stabulation identiques à celles de l'étude principale.

Les animaux ont là aussi été acclimatés durant au minimum 7 jours avant toute manipulation.

### 3.1.2 *Chirurgie et préparation des animaux*

La chirurgie d'implantation a été effectuée selon un protocole validé (Pellissier *et al.*, 1996; Merle *et al.*, 2000). Les rats ont été anesthésiés par injection IM de kétamine/xylasine (125mg/kg et 0,15mg/kg).

La première partie de la chirurgie a été consacrée à l'implantation des électrodes d'enregistrement : des fils de nickel/chrome d'un diamètre de 80µm (Microfil Industries, Lausanne, Suisse). Trois électrodes ont été implantées au niveau de la musculature du jéjunum.

La deuxième partie de l'implantation a consisté en l'implantation de l'électrode de stimulation vagale selon le même protocole que dans l'étude principale. Ensuite, l'électrode de stimulation vagale ainsi que les électrodes d'enregistrement ont été amenées, par tunnelisation sous-cutanée, jusqu'à la partie postérieure du crâne et branchées au connecteur fixé au crâne des animaux. Le connecteur a été relié via le collecteur tournant au système de stimulation et au système d'enregistrement (EMG100C, Biopac, CEROM, Paris, France).

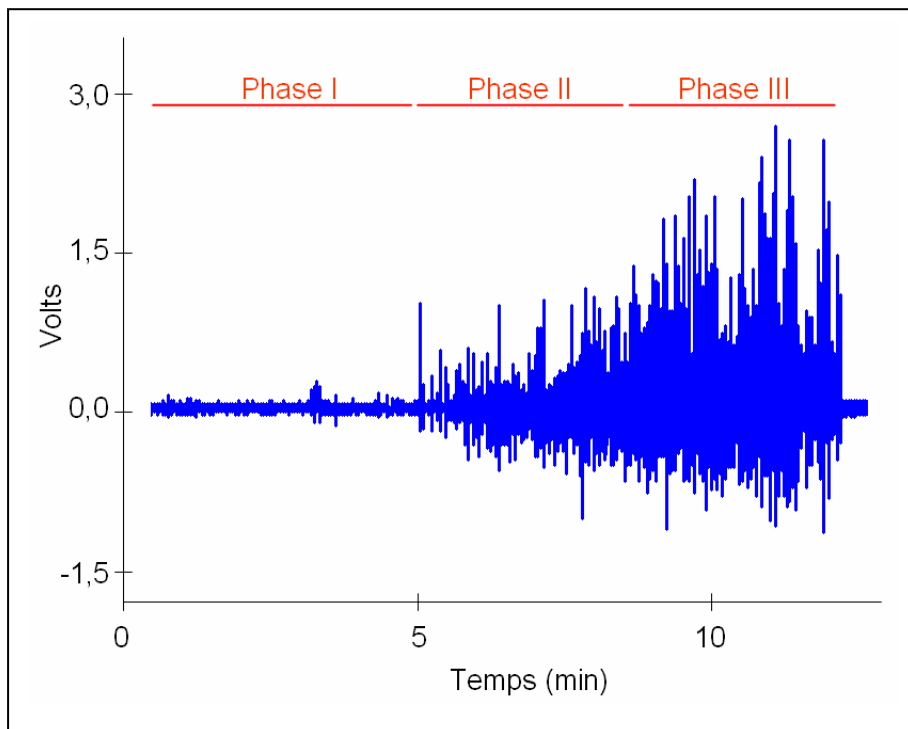
### 3.1.3 *Stimulation, enregistrement et traitement des CMM*

Après une récupération de 3 jours, les contractions musculaires ont été enregistrées sur des animaux mis à jeun 12h auparavant pour obtenir des CMM. Dans un premier temps, un enregistrement contrôle de 3h a été réalisé en l'absence de stimulation vagale, ensuite un enregistrement a été effectué durant les 3h de VNS (1mA, 5Hz, 500µs, 10s ON, 90s OFF). Les enregistrements ont été faits durant plusieurs jours jusqu'à ce que les contractions ne soient plus visibles sur les enregistrements témoins, cela principalement en raison de la désimplantation des électrodes.

### 3.2 Résultats

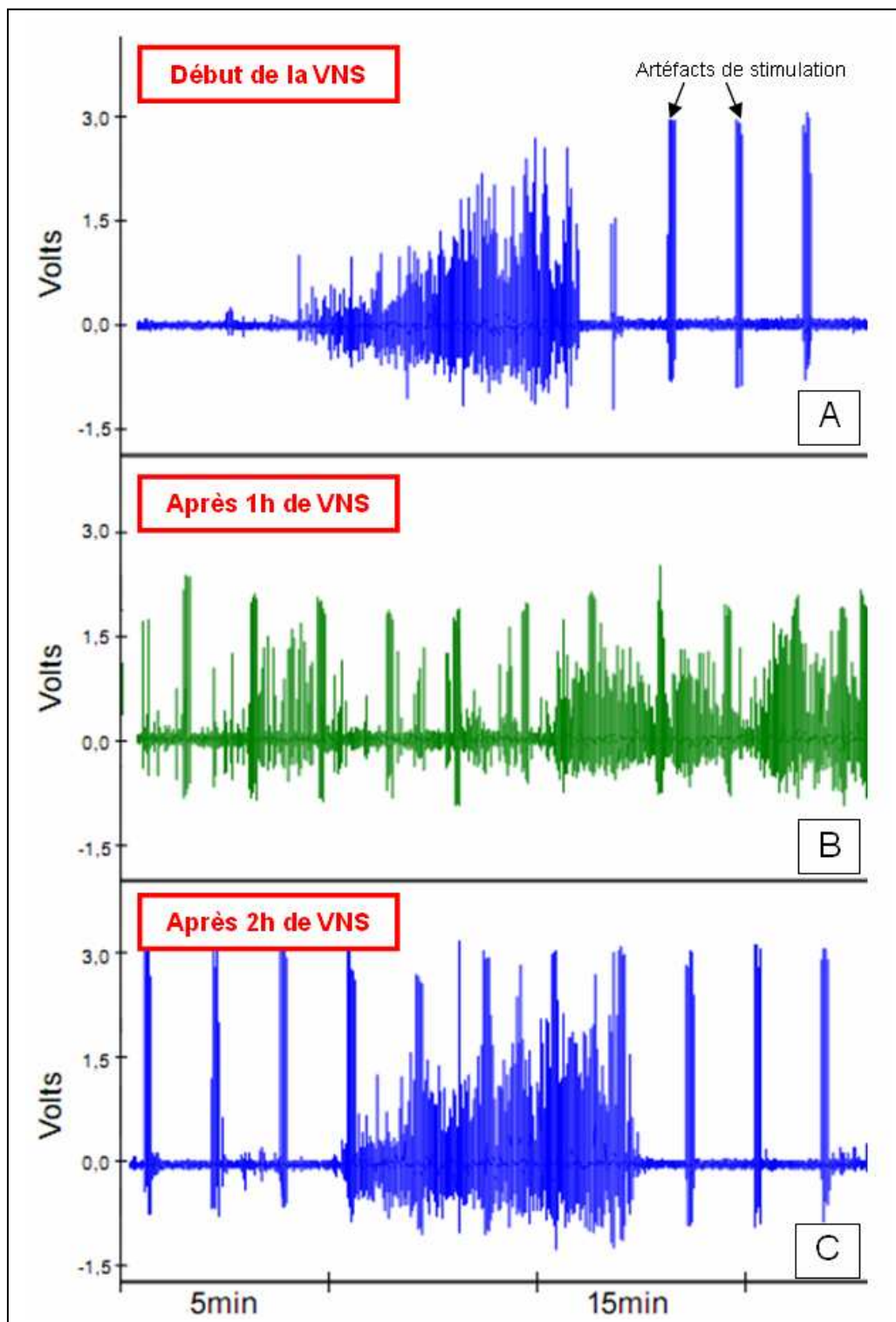
Les résultats de cette expérience sont montrés dans les figures 36 et 37.

Chez les rats à jeun et non stimulés les CMM sont présents, avec les trois phases bien distinctes comme le montre la figure 36 (Bonaz *et al.*, 1991; Pellissier *et al.*, 1996).



**Figure 36** : CMM chez un rat non stimulé.

Après vérification de la présence des CMM, nous avons donc effectué l'enregistrement pendant la stimulation vagale (figure 37).



**Figure 37** : effet de la VNS sur l'électromyogramme des CMM.

**A** : début de la stimulation ; **B** : Après 1h de VNS ; **C** : Après 2h de VNS.

Dès le début de la mise en marche de la VNS, les artéfacts de stimulation apparaissent sur l'électromyogramme (figure 37A). Dans la première heure de stimulation,

une modification des CMM apparaît, avec allongement de la durée de la phase II et de la durée totale des CMM (figure 37B et tableau 6) :

- phase II :  $12,6 \pm 4,7$  min contre  $4,0 \pm 0,89$  min pour les contrôles,
- durée total des CMM :  $22,1 \pm 4,9$  min contre 14,8 min pour les contrôles.

Après 1h de VNS, aucune modification des CMM n'est observée (figure 37C et tableau 6).

Aucune modification de la durée des phases I et III n'a été observée quelle que soit la durée de stimulation (Tableau 6).

|          | Durée          |               |                |               |
|----------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|          | CMM total      | Phase I       | Phase II       | Phase III     |
| Contrôle | $14,8 \pm 0,9$ | $6,6 \pm 0,8$ | $4,0 \pm 0,8$  | $4,2 \pm 0,4$ |
| VNS 1h   | $22,1 \pm 4,9$ | $5,8 \pm 0,4$ | $12,6 \pm 4,7$ | $3,8 \pm 0,1$ |
| Contrôle | $15,5 \pm 2,0$ | $5,6 \pm 1,6$ | $6,1 \pm 1,0$  | $3,9 \pm 0,2$ |
| VNS 2h   | $14,4 \pm 1,1$ | $5,2 \pm 0,5$ | $5,2 \pm 1,2$  | $4,0 \pm 0,1$ |
| Contrôle | $16,0 \pm 1,4$ | $5,5 \pm 0,4$ | $6,8 \pm 1,3$  | $3,7 \pm 0,1$ |
| VNS 3h   | $15,5 \pm 1,8$ | $4,9 \pm 0,3$ | $7,1 \pm 1,9$  | $3,4 \pm 0,4$ |
| Contrôle | $19,9 \pm 4,0$ | $6,6 \pm 1,9$ | $9,1 \pm 3,9$  | $4,2 \pm 0,3$ |
| Post VNS | $14,2 \pm 1,0$ | $5,1 \pm 0,5$ | $5,2 \pm 0,9$  | $3,9 \pm 0,1$ |

**Tableau 6** : effet de la VNS sur la durée totale des CMM et des différentes phases I, II et III, selon la durée de stimulation. Les durées contrôles correspondent aux durées obtenues chez les rats sans VNS au même moment de la journée (N=5).

### 3.3 Discussion

Cette étude sur la motricité intestinale a montré que la VNS avait des effets périphériques autres que l'action anti-inflammatoire. En effet, il apparaît que la VNS induit des modifications de la périodicité des CMM et de la durée de la phase II dans la première heure de stimulation. Ces modifications disparaissent et le groupe VNS retrouve des CMM identiques à ceux observés dans le groupe contrôle après 1 heure de stimulation. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque la phase II des CMM a été précédemment décrite comme étant dépendante de l'ACh (Hall *et al.*, 1983). La stimulation vagale engendrerait donc une libération d'ACh périphérique qui produirait l'induction de phases II prolongées. Cependant, le fait que ces modifications n'apparaissent que durant la première heure de la stimulation malgré le prolongement de la VNS, laisse penser qu'il y a une voie plus complexe de régulation qui se met en place ou qu'il existe rapidement un phénomène « d'épuisement » du nerf vague. Cette étude ne permet pas de conclure quant à l'éventuelle perturbation de la motricité digestive et du transit intestinal en dehors de l'état de jeûne. Des études plus précises seront nécessaires pour savoir si les perturbations engendrées font intervenir uniquement la voie nerveuse ou passent aussi par la voie hormonale, et à quel niveau, c'est-à-dire au niveau central ou périphérique.

# **Conclusions et perspectives**

## Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier les effets d'une stimulation électrique du nerf vague à visée anti-inflammatoire périphérique appliquée à un modèle de colite expérimentale. Depuis sa découverte au début des années 2000 par l'équipe de Tracey (Borovikova *et al.*, 2000), de nombreux travaux ont été réalisés pour étudier les effets de l'activation de cette voie cholinergique et son utilisation chez plusieurs modèles expérimentaux d'inflammation chez l'animal. Actuellement, les mécanismes exacts empruntés par la cette voie ne sont pas clairement définis. En fait, s'il a déjà été démontré que le récepteur nAChR  $\alpha 7$  des macrophages intervenait dans la modulation cholinergique de l'inflammation, il a été récemment rapporté que d'autres récepteurs (notamment  $\alpha 4\beta 2$ , van der Zanden *et al.*, 2009b) et cellules immunitaires pourraient aussi être des cibles de cet effet anti-inflammatoire (Van Der Zanden *et al.*, 2009). De plus, les sites d'action sur les cellules immunitaires sont eux aussi encore à préciser. En effet, la modulation des cellules immunitaires pourrait se faire soit de manière systémique via la rate soit de manière locale par une innervation vagale directe.

Malgré ces incertitudes concernant les réels mécanismes d'action, les applications potentielles de la voie cholinergique anti-inflammatoire sont très étudiées et prometteuses. Des équipes sont ainsi parvenues à moduler chez l'animal des inflammations systémiques comme le choc septique (Borovikova *et al.*, 2000) ou locales telles que l'iléus post-opératoire (The *et al.*, 2007).

L'activation de cette voie anti-inflammatoire est obtenue pharmacologiquement ou par la stimulation électrique. Cependant, dans la plupart des cas d'électrostimulation, les expériences sont réalisées de manière aiguë, c'est-à-dire sur des animaux anesthésiés et stimulés immédiatement après mise en place de l'électrode sur le nerf vague. De plus, celui-ci est souvent sectionné au-dessus de l'électrode afin de ne stimuler que les afférences vagales et ainsi de se prémunir d'un effet anti-inflammatoire via l'activation de l'axe corticotrope par les afférences vagales.

Dans notre cas, nous avons non seulement choisi d'étudier la modulation d'une inflammation digestive, la colite, mais en plus, nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales les plus proches de celles qui seraient employées en clinique (notamment par homologie à la VNS utilisée pour le traitement de l'épilepsie). Pour cela,

nous avons choisi de réaliser une implantation chronique de l'électrode et de pratiquer des stimulations répétées du nerf vague intact pendant plusieurs jours.

L'étude principale a permis de montrer un effet bénéfique de la VNS dans un modèle de colite chez le rat. La stimulation chronique du nerf vague a en effet induit une réduction de la perte de poids et de la myéloperoxydase tissulaire, marqueur classique de l'inflammation locale, une amélioration anatomopathologique, et une diminution de l'index global d'inflammation. Les études concernant les mécanismes de cet effet anti-inflammatoire sur le modèle de colite au TNBS ont montré qu'au cinquième jour la VNS avait un effet modéré sur les macrophages contrairement aux résultats obtenus dans une étude portant sur l'iléus post-opératoire (The *et al.*, 2007). En revanche, notre expérimentation a montré que la balance immunitaire Th1-Th17/Th2 était affectée par la VNS ce qui n'avait jamais été mis en évidence auparavant.

Le fait que la VNS modifie la balance Th1-Th17/Th2, nous permet d'envisager que les lymphocytes puissent être l'une des cibles cellulaires de la voie cholinergique. D'autres études seront donc indispensables pour caractériser la cascade cellulaire aboutissant à l'effet lymphocytaire et préciser les voies intracellulaires impliquées.

Nous ignorons cependant si la VNS a pour effet de rétablir la balance Th1-Th17/Th2 quel que soit le déséquilibre initial ou si elle induit toujours une diminution des Th1-Th17. Cette question demeure importante puisque le déséquilibre Th1-Th17/Th2 est toujours observé dans le cas des MICI, mais dans la RCH celui-ci est en faveur des Th2, contrairement à la MC où ce sont les Th1-Th17 qui sont augmentés (Sanchez-Munoz *et al.*, 2008). Si la VNS a pour effet de rétablir la balance Th1-Th17/Th2, quel que soit le déséquilibre initial, alors rien ne s'oppose à l'utilisation potentielle de la stimulation vagale dans le traitement de la RCH. Au contraire, si la VNS induit toujours une diminution des Th1, alors celle-ci serait contre indiquée dans le cas de la RCH, puisqu'elle pourrait induire une aggravation de la maladie en augmentant le déséquilibre. Toutefois l'utilisation de la VNS présente plus d'intérêt dans le cas de la MC, maladie difficile à traiter. En effet, la RCH répond relativement bien au traitement par les 5-ASA et ses lésions sont situées sur les tissus digestifs distaux présentant une innervation vagale faible (notamment le rectum).

A l'issue de nos travaux, certaines questions se posent. Tout d'abord, les paramètres de stimulations utilisés avaient été précédemment décrits comme étant préférentiellement activateurs des efférences vagales. Cependant, dans nos conditions

expérimentales, sans vagotomie au dessus de l'électrode, nous ne pouvons pas écarter une activation potentielle de l'axe corticotrope via une stimulation des afférences vagales et affirmer avec certitude que l'effet anti-inflammatoire passe uniquement par la voie cholinergique périphérique. Néanmoins, même si de futures études montrent que dans nos conditions expérimentales l'axe corticotrope est également activé, il n'en demeure pas moins que l'effet anti-inflammatoire d'origine centrale pourrait être intéressant comme nouvelle technique thérapeutique chez l'Homme dans le cas des MICI. La VNS aurait en fait un double effet anti-inflammatoire, d'une part avec la voie cholinergique anti-inflammatoire et d'autre part via l'activation de l'axe corticotrope.

Des expérimentations complémentaires sur l'effet de la VNS seront donc nécessaires pour répondre aux questions posées par nos résultats :

- étude de la mécanistique afin de préciser les sites d'action, les cellules immunitaires cibles, les récepteurs membranaires et les voies intracellulaires impliqués dans la modulation de l'inflammation digestive par la VNS.
- évaluation de l'applicabilité de la VNS à d'autres modèles d'inflammation digestive.

En ce qui concerne notre étude sur les effets secondaires de la VNS, elles ont permis de montrer que la VNS n'avait pas seulement un effet de modulation de l'inflammation, mais également des effets latéraux sur le SNC et sur la motricité intestinale.

L'étude de la motricité digestive a montré que la VNS chronique n'induisait que des effets secondaires modérés et transitoires au niveau de l'intestin grêle. L'adaptation des paramètres de stimulation pourrait permettre de minimiser ces effets.

L'étude de l'action de la VNS sur l'induction de *c-fos* au niveau du NTS a mis en évidence que les paramètres de stimulation utilisés, bien que décrits comme n'ayant pas d'effet via les afférences, induisaient malgré tout une modification de l'activation neuronale au niveau central .

D'autres études, en particulier par la technique d'IRMf sont en cours de réalisation pour savoir si nos paramètres de stimulation induisent des modifications de l'activité cérébrale.

Enfin, de nouvelles perspectives sont intéressantes en ce qui concerne le déclenchement de la VNS uniquement lors des déséquilibres de l'activité des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. En effet, l'activité de ces deux systèmes antagonistes semble être quantifiable par l'intermédiaire de l'étude des modifications de la variabilité cardiaque. Ce paramètre pourrait donc permettre de mesurer en temps réel l'équilibre de l'activité sympathique/parasympathique, de détecter d'éventuelles perturbations de celui-ci et ainsi déclencher la VNS afin de corriger les effets neuro-immunitaires.

# **Annexe**

**(article soumis à la revue « Gut »)**

# Vagus nerve stimulation improves TNBS-induced colitis in rat

J Meregnani<sup>1</sup>, D Clarençon<sup>1,2</sup>, M Vivier<sup>2</sup>, A Peinnequin<sup>1,2</sup>, C Mouret<sup>2</sup>, V Sinniger<sup>1</sup>, C Picq<sup>1,2</sup>, A Job<sup>2</sup>, F Canini<sup>1,2</sup>, M Jacquier-Sarlin<sup>1</sup> and Bruno Bonaz<sup>1,3</sup>

The first two authors have done the same contribution in the achievement of this work  
Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), Centre de Recherche INSERM U836 UJF-CEA-CHU, Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Antenne de La Tronche, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, BP87, 38702 La Tronche, France.

Clinique Universitaire d'Hépto-Gastroentérologie, CHU de Grenoble, BP217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

**Correspondence to:** Bruno Bonaz, MD-PhD, Stress et Interactions Neuro-Digestives (SIND; EA3744), Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), Centre de Recherche INSERM U836 UJF-CEA-CHU, Bâtiment Edmond J. Safra des Neurosciences, chemin Fortuné Ferrini, Université Joseph Fourier, Site Santé La Tronche, BP170, 38042 Grenoble Cedex 09, France. Phone: +33 4 76 76 55 97; Fax: +33 4 76 76 52 97; E-mail: BBonaz@chu-grenoble.fr.

**Abbreviations:** Ach, acetylcholine; ARBP, acidic ribosomal phosphoprotein P0; CD, Crohn's disease; CyCA, Cyclophylin A; HPA, hypothalamic pituitary adrenal; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IBD, inflammatory bowel diseases; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL, interleukin; im, intramuscularly; JAK, Janus kinase; MPO, myeloperoxidase; NFκBIA, nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, α; RU, relative unit; SC, standardized coefficient; SOCS, suppressors of cytokine signalling; STAT, signal transducers and activators of transcription; TBX21, T-box 21; Th, T-helper cell; TNBS, trinitrobenzene sulfonic acid; TNF, tumor necrosis factor; VN, vagus nerve; VNS, vagus nerve stimulation; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor.

## Abstract

**Background and aims.** Vagus nerve stimulation (VNS) is used for treatment-resistant epilepsy and depression. In addition, anti-inflammatory properties of VNS have been reported in experimental models of

inflammation but not in colitis. These effects are mediated by the cholinergic anti-inflammatory pathway through vagal efferents. Our aim was to evaluate the effects of chronic VNS on rat colitis and characterize its anti-inflammatory mechanism. **Methods.** Colitis was induced in rats by intracolonic instillation of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). VNS was performed in freely moving animals 3h per day for five days. Efficacy of VNS was evaluated on physiological and local parameters both at the level of the damaged colon and immediately above and a global multivariate index of colitis was generated. **Results.** VNS induced a significant improvement of physiological parameters such as body weight loss and a reduction of inflammatory markers in mild damaged tissues as observed by histological score and myeloperoxidase quantification above the lesion. This effect was associated to a reduction of the multivariate index of colitis: the most important parameters corresponded

to TNF mRNA above the lesion and IL-6 and SOCS3 mRNAs in the lesion. TNBS colitis induced significant increase levels of STAT4 in and above the lesion and its active phosphorylated form above the lesion which were improved by VNS. *Conclusion.* All together, these data describe a novel mechanism by which VNS chronically performed in awakened animals exerts anti-inflammatory properties through STAT4 pathway and open therapeutic avenue for the use of VNS in patients with inflammatory bowel diseases.

## Introduction

Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel diseases (IBD) remains a challenging theory with implications on the influence of brain-gut axis on intestinal inflammation and its perpetuation [1,2]. Circulating pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF), released from the intestinal mucosa are able to communicate with the brain through neural and humoral pathways (Sucholeiki *et al.*). The neural pathway involves vagus nerve (VN) afferents locally stimulated by cytokines to activate the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis (Sucholeiki *et al.*). More recently, Tracey's group reported an anti-inflammatory role of vagal efferents through the cholinergic anti-inflammatory pathway; acetylcholine (ACh) released at the distal end of the VN, interacts with the  $\alpha$ -7 nicotinic ACh receptor ( $\alpha$ 7nAChR) on macrophages to inhibit the release of

proinflammatory cytokines such as TNF [4, 5].

At the level of the gastro-intestinal tract, the anti-inflammatory role of the cholinergic pathway has been demonstrated in models of pancreatitis [6], dextran sulfate sodium-colitis [7], dinitro or trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) colitis [8, 9] and post-operative ileus [10]. This effect is produced (i) either pharmacologically, using selective  $\alpha$ 7nAChR agonists [6, 10, 11], central injections of CNI-1493 [12], peripheral or central cholinesterase inhibitors [8, 13], (ii) by vagotomy [7] or (iii) through acute VN stimulation (VNS) [14] but the effect of VNS has never been studied in experimental colitis. VNS has been approved by the FDA as therapy for treatment-resistant epilepsy or depression [15] through high frequency stimulation (20-30Hz) of vagal afferents [15] while the use of low frequency stimulation (1-10Hz) [14, 16, 17] is supposed to activate vagal efferents i.e. the cholinergic anti-inflammatory pathway.

The vagal anti-inflammatory pathway acts through  $\alpha$ 7 subunit-mediated Janus kinase (JAK)2- Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)3 activation in a model of postoperative ileus [14]. Crohn's disease (CD) is mediated by an increase of T helper (Th)1 and Th17 pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IL-17 and TNF while ulcerative colitis seems to be of Th2 type [18,

19]. STAT4 is a critical regulator of T cell response and mediates a pro-inflammatory response with an increase of naïve T cells development and differentiation in Th1 or Th17 [20, 21, 22]. TNBS colitis shares many of the histopathological and clinical features of CD [23], exhibits Th1-Th17 response [20] and induces an activation of STAT4 [24]. Consequently, our aim was to evaluate the anti-inflammatory effect of chronic VNS in a model of TNBS colitis in rats. For this purpose, we have: (i) performed VNS in freely moving animals, chronically implanted with an electrode on the left cervical VN using stimulation parameters known to activate vagal efferents, (ii) studied the effect of VNS on TNBS colitis using a multiparametric index of colitis and (iii) examined if VNS interfered with the molecular signaling underlying the Th1-Th17 type response through STAT4 pathway.

## **Methods**

### *Animals*

Adult male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest St Isle, France) were individually housed in a controlled environment. Animals were weighted before induction of colitis and at the end of the experiment. Procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive and

guidelines of the local ethical animal research committee.

### *Surgical procedures*

Rats were anaesthetized with a mixture of ketamine (125mg/kg intramuscularly, im) and acepromazine (0.15mg/kg im). A telemetric device (Physiotel TA10TAF40, Data Sciences International, MN, USA) was implanted into the abdominal cavity to record body temperature and locomotor activity [25]. Then, the left cervical VN was identified and an electrode (Cyberonics, Lyon, France) was gently wrapped around the VN and carotid [26] and linked to a connector fixed to the rat's head with dental cement. The connector was linked to a stimulator chain (S88, SIU5, CCU1, Grass Technologies, Astro-Med, RI, US) through a slip ring (TA13EEG12F2, Air Precision, Le Plessis Robinson, France).

### *Induction of colitis*

Twelve days after surgery, rats deprived of food for at least 12h were anaesthetised (50mg/kg ketamine and 0.05mg/kg acepromazine im). A 7.5cm length cannula was inserted into the colon and TNBS (Fluka, St Quentin Fallavier, France) was instilled at a dose of 10 mg per rat in 50% ethanol (total volume, 0.25 ml) [23, 27]. Controls received saline.

### *Vagus nerve stimulation*

VNS was performed in freely moving animals 3h per day (9.00 am to 12.00 am) for five days, starting 1h before instillation, with stimulation parameters (1mA, 5Hz, pulse width of 500µs; 10s ON, 90s OFF; continuous cycle) adapted from previous studies [16, 28]. Control rats were implanted according to the same procedure but not stimulated.

### *Experimental groups*

Rats were randomly assigned to one of four treatment groups (n=12 rats per group): 1) non-stimulated/saline injected (controls), 2) stimulated/saline injected (VNS/saline), 3) non-stimulated/TNBS injected (noVNS/TNBS) and 4) stimulated/TNBS injected (VNS/TNBS).

### *Assessment of colonic inflammation*

Five days after instillation, rats were anesthetized and transcardially perfused with saline. The distal colon (8cm from the anus) was isolated, opened longitudinally and photographed for quantification of colonic damages by determining three areas (normal, moderate and severe inflammation) using colorimetric evaluation (Visilog 6 software, NOESIS, Crolles, France). Colonic samples were then separated in 2 parts: i) the damaged colon, ii) the macroscopically normal colon immediately above the lesion.

Samples of lesion and above lesion were cut longitudinally in five equal parts for i) histological analysis, ii) myeloperoxidase (MPO) assay, iii) mRNA quantification, iv) western blot analysis, v) immunohistochemistry.

### *Histological analysis*

Colonic sections (5µm) were stained with H&E and graded qualitatively (Vetopath Society, Sofia-Antipolis, France). Epithelial damages (erosions, ulcers, necrosis), inflammatory changes (infiltration of mono and polymorphonuclear cells, vascular changes) and distribution of lesions (focal, diffuse, transmural) were blindly evaluated [29]. A score distinguishing four major grades was used: grade 0 (normal mucosa), grade I (mild, focal increase of subacute inflammatory infiltrate), grade II (moderate, patchy, or diffuse increase of inflammatory infiltrate in lamina propria, erosions), grade III (marked inflammation with ulcerations, and/or superficial necrosis), grade IV (severe acute inflammation with transmural necrosis).

### *Myeloperoxidase quantification*

Colonic samples were homogenised and quantified for MPO concentration by ELISA kit (HK210, Hycult biotechnology, Uden, The Netherlands).

*Quantification of cytokine (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) and cytokine-related (ICAM1, NF $\kappa$ BIA, SOCS3, TBX21)*

*mRNAs mRNA isolation and reverse transcription reaction.* Preconditioned colonic samples in RNALater (Qiagen, Courtaboeuf, France) were disrupted in lysis buffer (Qiagen). mRNA was isolated using MagNA Pure LC mRNA isolation kit II in a MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science Meylan, France). Reverse transcription was carried out using the Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Angers, France) with 50  $\mu$ M oligo (dT) 15 primer and RNase inhibitor (2 U).

*Real time quantitative PCR.* PCR was carried out with LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science). PCR was performed using a Lightcycler (Roche Applied Science) for 45 cycles at 95°C for 20 sec, 58°C [except T-box 21 (TBX21): 56°C, acidic ribosomal phosphoprotein P0 (ARBP) and nuclear factor of  $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor  $\alpha$  (NF $\kappa$ BIA): 57°C, hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) and IL-6: 60°C] for 5 sec, and a final step of 10 sec at 72°C. Quantification was achieved using a pool of all the cDNA samples as calibrator according to the comparative threshold cycle method

[30] with efficiency correction [31] using geometric average of three internal validated control genes [Cyclophilin A (CycA), ARBP, HPRT] [32]. Therefore, ARBP, CycA, and HPRT were used for normalization.

*Primer design.* Primer design, optimization and specificity checking were done as described previously [33]. GenBank accession numbers used for the primers design were for ARBP: NM\_022402; CycA: NM\_017101; HPRT: NM\_012583; intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1): NM\_053565; IL-1  $\beta$ : NM\_031512; NF $\kappa$ BIA: XM\_343065; suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3): NM\_053565; TBX21: XM\_220914 and TNF $\alpha$ : NM\_012675. IL-6 (GenBank NM\_012589) primers present LNA-substitutions (NL) as described previously [34].

#### *Western blot analysis*

Colonic samples were directly frozen in liquid nitrogen. Protein concentrations in digestive lysates, prepared as for MPO quantification, were determined using BCA assay (Pierce, Rockford, IL, US). Proteins extracts were processed as previously described [35]. Primary antibodies dilutions were 1:1000 for STAT4 and Tyr693 (P)-STAT4 (Signalway Antibody, Euromedex, Souffelweyersheim, France).

### *Imunohistochemistry*

Colonic samples were fixed in 4 % paraformaldehyde, postfixed and cryoprotected at 4 °C for 5 days in the same fixative containing 30 % sucrose. Frozen sections (16µm) were cryostat cut (Microm HM500M, Francheville, France), fixed in cold acetone at -20°C and treated for quenching of endogenous peroxidase with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol at room temperature. Tissue sections were blocked in PBS containing 1% goat serum (blocking solution) and then incubated with anti-P-STAT4 antibody. Sections were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG in blocking buffer (Vector Laboratories, Abcscys, Paris, France) and finally stained by indirect immunoperoxidase procedure using the avidin/biotin complex procedure (Vectastain kit, Vector Laboratories, L'Isle d'Abeau, France). A complementary coloration was made with haematoxylin. Tissue sections were analysed with a Zeiss microscope (Axioskop, Carl Zeiss, Zaventem, Belgium) equipped with a digital camera (Color Mosaic 11.2, Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI, US).

### *Multivariate index of colitis*

Many parameters are involved in the inflammatory process. Therefore, in addition to currently studied parameters like body weight or MPO quantification, additional

physiological and molecular parameters were studied (telemetric data, areas of lesion, cytokine and cytokine- related mRNAs). More than a univariate analysis on each parameter, we performed a multivariate analysis by using the following parameters: a) means of body temperature and locomotor activity during the two dark periods following instillation, b) geometric means of damaged areas, c) cytokine and cytokine-related mRNAs (TNF, IL-1β, IL-6, ICAM1, NFκBIA, SOCS3, TBX21) quantified in the two areas. Cytokine and inflammatory marker mRNAs were analysed together by a multivariate analysis to allow a general evaluation of the clinical and inflammatory states of rats. A linear discriminant analysis was first performed on control- and noVNS/TNBS groups to characterize colitis. Canonical coefficients obtained were then applied to VNS/saline and VNS/TNBS groups. The relative contribution of each parameter presented here in the discriminant model was ranked by partial Wilks lambda. The unstandardized coefficients of the model were used to calculate for each rat a general weighted score for colitis inflammation. This multivariate index allows a better characterization of the colonic inflammatory profile. Discriminant score was obtained by multiplying the coefficient by the value of measured parameters. The higher the coefficient in absolute value was, the more

important its contribution to colitis was. The inflammatory index was used to test the effects of VNS between noVNS/TNBS and VNS/TNBS groups.

### *Statistical analysis*

For all results, a Mann-Whitney test was used. A p value <0.05 was considered as statistically significant. All data are expressed as mean  $\pm$  sem.

## **RESULTS**

### *Effects of VNS on circadian body temperature after colitis induction*

Baseline circadian temperatures were similar for four groups of rats before instillation of TNBS or saline. Rats had higher body temperature during the dark period and a lower one at light period; this coincided with a decrease of spontaneous locomotor activity (data not shown). The same pattern was observed 12h after instillation in both control and VNS/saline groups (Figure 1). Rats with colitis presented a disruption in normal thermoregulation which started during the first night following TNBS instillation. During this period, noVNS/TNBS injected rats exhibited a significant hypothermia ( $-0.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ,  $p < 0.001$  vs control) while they displayed a non significant increase of body temperature during the light period. An improvement was observed during the night

in VNS/TNBS group with no significant effect of VNS compared to noVNS/TNBS group (Figure 1). The same effect was reported during the following day (day 2; data not shown).

### *Effect of VNS on classical evaluation of colitis*

#### *Body weight loss*

A significant weight loss, expressed as the percentage of body weight change, was observed in noVNS/TNBS ( $-4.1 \pm 1.1\%$ ) compared to control group ( $14.5 \pm 1.3\%$ ) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 2). In contrast, a significant decrease of weight loss ( $-0.3 \pm 1.5\%$ ) was observed in VNS/TNBS animals compared to noVNS/TNBS animals ( $p = 0.04$ ) (Figure 2).

#### *Macroscopic assessment*

No macroscopical damage of the recto-colon was observed after saline. In animals receiving TNBS/ethanol, either stimulated or not, macroscopic colonic damages were observed between 3 and 7cm proximal to the anus. Quantification of colonic damages showed a non significant decrease in VNS/TNBS animals (data not shown).

#### *Histological assessment*

No histological damage was observed in saline injected animals with or without VNS (grade 0) (Figure 3A, D). TNBS induced mucosal lesions: grade 0 and II above the lesion (Figure 3B, D) and grade II and IV in

the lesion (Figure 3C, D). Histological scores in the lesion were not modified by VNS (grade I and IV) (Figure 3C, D) while colonic tissue above the lesion was relatively protected by VNS and showed a lower degree of inflammation (grade 0 and I) (Figure 3B, D).

#### *Myeloperoxidase quantification*

TNBS induced a significant increase of MPO concentration both at the level of macroscopic colitis and just above the damaged colon ( $1426.6 \pm 119.4$  ng/mg and  $23.9 \pm 6.0$  ng/mg protein respectively) when compared to control group ( $6.1 \pm 2.5$  ng/mg protein) ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.008$  respectively) (Figure 4). Compared to noVNS/TNBS, VNS/TNBS animals presented a decrease of MPO concentration which was significant only at the level of the colon above the lesion ( $9.5 \pm 4.2$  ng/mg protein versus  $23.9 \pm 6.0$  ng/mg protein,  $p = 0.03$ ) (Figure 4).

#### *Effect of VNS on cytokines' mRNA levels after colitis induction*

TNBS induced a significant increase of both TNF and IL-6 mRNAs in the lesion compared to the control group (respectively  $1.49 \pm 0.12$  relative unit (RU) vs  $0.55 \pm 0.06$  RU,  $p = 0.0001$ ; and  $2.19 \pm 0.36$  RU vs  $0.10 \pm 0.10$  RU,  $p < 0.0001$ ) (Figure 5A, B). VNS induced a non significant decrease of these two mRNA levels (Figure 5A, B). This tendency was generally observed for other

cytokine and cytokine-related mRNA levels e.g. IL-1 $\beta$ , SOCS3, NF $\kappa$ BIA, ICAM-1, TBX21 (data not shown). Interestingly, a significant decrease of TNF mRNA was observed in VNS/saline group compared to control ( $0.33 \pm 0.05$  RU vs  $0.55 \pm 0.06$  RU,  $p < 0.01$ ) (Figure 5A).

#### *Effect of VNS on multivariate index of colitis*

Figure 6A shows that all studied parameters contribute to the inflammation observed in TNBS colitis and that the model of multivariate analysis is significant (Lambda Wilk: 0.050; F approx (17.7) = 7.814;  $p < 0.0051$ ). According to the standardized coefficient (SC), some of these parameters more particularly contributed to the inflammatory process in the lesion, such as IL-6 (SC: 4.027) and SOCS3 (SC: 3.622) while some parameters such as the locomotor activity (SC: 0.432 and 0.093) were less involved.

In noVNS/TNBS animals, a significant increase of the multivariate index of colitis was observed compared to the control group ( $9.35 \pm 0.34$  RU vs  $0.99 \pm 0.22$  RU,  $p < 0.0001$ ) (Figure 6B). VNS induced a significant decrease of the same multivariate index (all previous parameters included) of colitis compared to noVNS/TNBS rats ( $3.49 \pm 1.98$  RU,  $p < 0.001$ ) (Figure 6B).

### *Molecular signalling of VNS anti-inflammatory effect*

Analysis by western blotting indicated no differences in the expression of STAT3 and STAT6 proteins induced by VNS during colitis (data not shown). In contrast we found a modification in the expression of STAT4 (Figure 7A). Indeed, TNBS induced a non-significant increase of STAT4 in the colonic tissue above the lesion ( $0.90 \pm 0.05$  RU) while this increase was significant in the lesion ( $3.96 \pm 0.60$  RU,  $p < 0.001$ ) compared to control ( $0.64 \pm 0.08$  RU) (Figure 7B). However, VNS significantly decreased the level of STAT4 proteins in TNBS animals either at the level of the lesion ( $1.60 \pm 0.23$  RU) or above ( $0.55 \pm 0.10$  RU). This decrease was higher in the lesion ( $p = 0.002$  and  $p = 0.02$  respectively) (Figure 7B). No significant variations of P-STAT4 were observed in TNBS treated animals both in the lesion ( $1.87 \pm 0.43$  RU) and above ( $0.8 \pm 0.09$  RU) compared to control group ( $1.27 \pm 0.18$  RU) (Figure 7C). However, a non significant decrease of P-STAT4 was observed in VNS/TNBS animals (Figure 7C). To further confirm this tendency, we performed immunohistochemical detection of P-STAT4 in the colonic tissue above the lesion (Figure 8). This approach presents the advantage of focusing the positive cells

inside the tissue. Compared to control tissues (Figure 8A), TNBS induced a mucosal infiltration of leukocytes, with an increase of P-STAT4 immunoreactive cells in the submucosa (Figure 8B). VNS application reduced both the number of mucosal infiltrated cells and the P-STAT4 labelling (Figure 8C).

### **DISCUSSION**

Our results are consistent with the hypothesis that VNS, performed chronically in freely moving rats, has an anti-inflammatory effect on an experimental model of colitis.

The role of the VN as a modulator of intestinal inflammation has been recently reviewed [36]. All the studies investigating the anti-inflammatory effect of VNS have been performed acutely in anesthetized animals and never on an experimental colitis [14, 17, 37]. To our knowledge, this is the first study on the effects of VNS performed in freely moving animals chronically implanted with electrodes on the left VN to study its effect on TNBS colitis. The choice to perform VNS for five days was based on the work of Miceli et al. [8] using a pharmacological approach with acetylcholinesterase inhibitors. This is also the delay for an acute inflammatory response with a transmural inflammation [8, 20, 23].

Our results indicate that VNS has a protective effect on colitis-induced weight loss, a classical parameter of colitis in humans and animals [23, 38, 39]. In our conditions, with the lowest dose of TNBS (10 mg/rat) to induce colitis [23], a 4% weight lost was observed which was reduced significantly to only 0.3% by VNS.

Histological, biochemical, and molecular assessments were performed in two areas: the macroscopic damaged colon (lesion) and the area immediately above. Qualitative histological evaluation supports the different effects of colitis in both areas with previously described modifications [8, 23, 27], while no macroscopic and microscopic lesions were observed in saline treated animals. Interestingly, VNS/TNBS rats had less inflammatory infiltrate above the lesion while only a poor effect was observed in the lesion compared to noVNS/TNBS. This argues for a major efficiency of VNS on low damaged tissues. This could be explained by the fact that the lesion is represented by damaged and necrotic cells with a low reactivity level to therapeutics. These results were further supported by MPO quantification. MPO is an enzyme predominantly found in neutrophils and currently used as a quantitative index of intestinal inflammation [40]. Previous studies [7, 8] have reported an important increase of MPO in colonic tissue without any

distinction between lesion and above. TNBS induced a very important increase of MPO not only in the lesion (>200 fold higher) but also above (4 fold higher). VNS significantly reduced MPO levels only above the lesion, indicating that it is very pertinent to analyze each area separately. This observation suggests that VNS therapy could be of interest for the treatment of mild colitis but also to prevent recurrence.

Inflammation is a complex, multi-scale biologic response to aggression and is also required for repair and regeneration after tissue injury with many parameters involved in the host response. Some current parameters (body temperature, cytokine mRNAs...) may have a non significant variation alone but may be important in the synergistic response. TNBS induced a sickness response characterized by a disruption of circadian rhythms with a lower body temperature during the dark period and a mild fever during the light period [41]. We observed a non significant improvement of body temperature during the dark period in VNS/TNBS group. In contrast to Tateishi et al. [42], TNBS colitis induced a significant increase of TNF and IL-6 mRNA at day 5, which was reduced by VNS. This discrepancy may be explained by the fact that they analyzed these cytokines at the protein level by ELISA at a time where they were probably still not produced.

Due to the synergistic property of inflammation, a global assessment seems more appropriate to consider all biological interactions [43]. Consequently, instead of a univariate analysis, we used a multivariate analysis to identify biological parameters that better discriminate colitis group (noVNS/TNBS) vs control group. Due to the discriminant analysis, a significant increase of this index was observed in noVNS/TNBS group while VNS significantly decreased this index by approximately three times in VNS/TNBS. In addition, values of standardized coefficients (range 0.093 to 4.027) allowed an evaluation of the significance of each parameter in the TNBS colitis model. The most two important parameters (i.e. high value) correspond to IL-6 and SOCS3 mRNAs measured in the lesion. Indeed, SOCS3 has a key role in the regulation of IL-6 signalling [44]. TNBS colitis shares many of the clinical, histopathological, and immunological features of CD which is characterized by an impairment of the Th1-Th17/Th2 inflammatory balance [20]. TNF, a key cytokine in IBD, is necessary for both the initiation and persistence of the Th1 response in TNBS colitis [45] and it is the most important parameter above the lesion in our study.

It has been proposed that VN improves colitis in rat models, an anti-inflammatory effect

mediated by the macrophage nAChR (for review [36]). STAT signalling pathways play an important role in the regulation of pro-inflammatory cytokines. Indeed, VNS attenuates macrophage activation by activating the JAK2-STAT3 signalling pathway in a mouse model of surgery-induced inflammation [14]. We did not observe any significant variations in STAT3/P-STAT3 induced by VNS in animals with colitis (data not shown) thus suggesting that the anti-inflammatory effect of VNS involves another pathway. Furthermore, this result is corroborated to the increase in IL6 and TNF mRNAs, two cytokines negatively regulated by STAT3 signalling. IBD are also believed to be T-cell driven processes, with both inflammation resulting from inappropriate cytokine production by subsets of CD4<sup>+</sup>T-Th cells [46] and defects in the regulatory T cell process [47]. STAT4 signalling is crucial in maintaining Th1 and Th17 response. TNBS acute colitis is characterized by a macrophage-derived cytokine profile, strong chemotactic pattern and a polarized Th1-Th17 panel with STAT4 activation [20, 24]. Therefore, we analysed STAT4 and P-STAT4 levels in colonic tissues. TNBS colitis induced significant increased levels of constitutive STAT4 in the lesion with a six-fold increase in noVNS/TNBS animals compared to the control group. Interestingly, VNS

significantly reduced the level of STAT4 both in the lesion and above. While we did not observe any modification of P-STAT4, the active form of STAT4, between all groups, it does not mean that there is no effect of VNS on STAT4 activation. Indeed, western blot analysis was performed on the whole colonic wall without any nucleus purification or mucosal insulation which should have improved the quantification of P-STAT4. However, immunohistological study revealed a P-STAT4 labelling of submucosa immune cells in noVNS/TNBS animals which was attenuated in VNS/TNBS animals. Altogether, these data propose a new mechanism by which VNS could regulate intestinal inflammation. Indeed, by regulating STAT4 signalling VNS could attenuate the skewed TH1-TH17 inflammatory responses induced by TNBS colitis. This pathway may act in concert to the STAT3 signalling since IL6 and TNF have been required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis [48].

The results of this study have clinical relevance. Indeed, because of its anti-inflammatory property, notably on the low damaged tissues and Th1-Th17/Th2 balance, VNS should be of interest in the treatment of IBD [49], particularly in case of mild colitis and/or in the prevention of recurrence. In addition, since overall intentional nonadherence is reported by 39% of IBD

patients [50], VNS therapy is of interest because it is independent of the patient compliance. Lastly, VNS activates an intrinsic anti-inflammatory pathway which might avoid side effects due to immunosuppressive and biological therapies.

### Acknowledgements

Authors would like to thank the involvement of Edgar Gentilhomme, Aurélie Faure, Jacques Mathieu (Institut de Recherche Biomédicale des Armées) and Marie-Hélène Laverrière (Département d'Anatomie et Cytologie, CHU Grenoble) for histological studies and for critical reading of the manuscript. This work was supported by Université Joseph Fourier, Direction Générale de l'Armement (DGA), INSERM, UCB Pharma, and from the Center of Medical Technology of St-Etienne, France.

### REFERENCES

- 1 Anton PA, Shanahan F. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"? *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:723-34.
- 2 Paschos KA, Kolios G, Chatzaki E. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: Prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 2009.
- 3 Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, et al. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 2000;85:60-5.
- 4 Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in

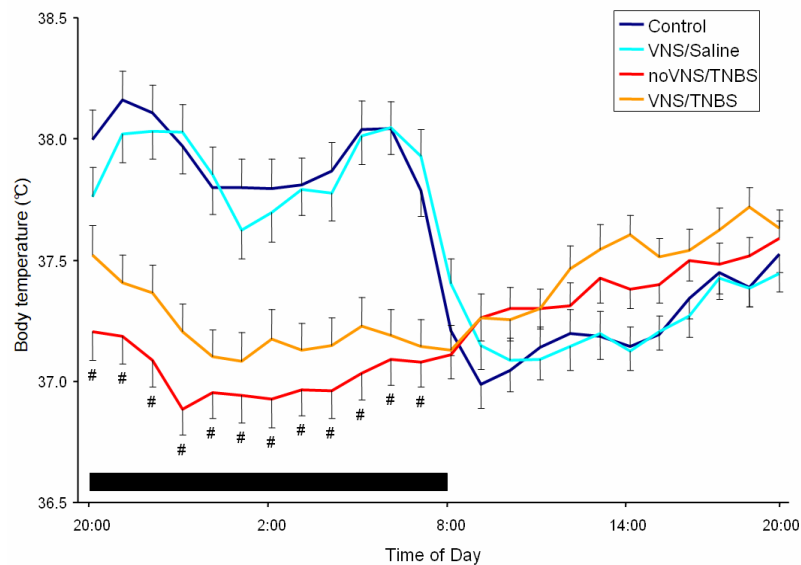
- neuroimmunomodulation. *Mol Med* 2003;9:125-34.
- 5 Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2009;9:418-28.
  - 6 van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* 2006;130:1822-30.
  - 7 Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, et al. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2006;131:1122-30.
  - 8 Miceli PC, Jacobson K. Cholinergic pathways modulate experimental dinitrobenzene sulfonic acid colitis in rats. *Auton Neurosci* 2003;105:16-24.
  - 9 Bai A, Guo Y, Lu N. The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on experimental colitis. *Scand J Immunol* 2007;66:538-45.
  - 10 The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2007;133:1219-28.
  - 11 de Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 2007;151:915-29.
  - 12 Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci* 2000;85:141-7.
  - 13 Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* 2009;23:41-5.
  - 14 de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005;6:844-51.
  - 15 Milby AH, Halpern CH, Baltuch GH. Vagus nerve stimulation for epilepsy and depression. *Neurotherapeutics* 2008;5:75-85.
  - 16 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002;195:781-8.
  - 17 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-62.
  - 18 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
  - 19 Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1152-67.
  - 20 Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008.
  - 21 O'Malley JT, Eri RD, Stritesky GL, et al. STAT4 isoforms differentially regulate Th1 cytokine production and the severity of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2008;181:5062-70.
  - 22 Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-84.
  - 23 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
  - 24 Coccia EM, Remoli ME, Di Giacinto C, et al. Cholera toxin subunit B inhibits IL-12 and IFN- $\gamma$  production and signaling in experimental colitis and Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1558-64.
  - 25 Chevrier C, Bourdon L, Canini F. Cosignaling of adenosine and adenosine triphosphate in hypobaric hypoxia-

- induced hypothermia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R595-600.
- 26 Handforth A, Krahl SE. Suppression of harmaline-induced tremor in rats by vagus nerve stimulation. *Mov Disord* 2001;16:84-8.
  - 27 Porcher C, Sinniger V, Juhem A, et al. Neuronal activity and CRF receptor gene transcription in the brains of rats with colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G803-14.
  - 28 Naritoku DK, Terry WJ, Helfert RH. Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* 1995;22:53-62.
  - 29 Geboes K, Desreumaux P, Jouret A, et al. [Histopathologic diagnosis of the activity of chronic inflammatory bowel disease. Evaluation of the effect of drug treatment. Use of histological scores]. *Gastroenterol Clin Biol* 1999;23:1062-73.
  - 30 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-8.
  - 31 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
  - 32 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
  - 33 Peinnequin A, Mouret C, Birot O, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 2004;5:3.
  - 34 Malgoyre A, Banzet S, Mouret C, et al. Quantification of low-expressed mRNA using 5' LNA-containing real-time PCR primers. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:246-52.
  - 35 Chartier NT, Laine M, Gout S, et al. Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* 2006;119:31-46.
  - 36 Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:6-17.
  - 37 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* 2002;36:1231-6.
  - 38 Rigaud D, Angel LA, Cerf M, et al. Mechanisms of decreased food intake during weight loss in adult Crohn's disease patients without obvious malabsorption. *Am J Clin Nutr* 1994;60:775-81.
  - 39 Ballinger AB, Azooz O, El-Haj T, et al. Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. *Gut* 2000;46:694-700.
  - 40 Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 1982;60:618-22.
  - 41 Boisse L, Van Sickle MD, Sharkey KA, et al. Compromised neuroimmune status in rats with experimental colitis. *J Physiol* 2003;548:929-39.
  - 42 Tateishi H, Mitsuyama K, Toyonaga A, et al. Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion* 1997;58:271-81.
  - 43 Vodovotz Y, Csete M, Bartels J, et al. Translational systems biology of inflammation. *PLoS Comput Biol* 2008;4:e1000014.
  - 44 Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503-29.
  - 45 Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549.

- 46 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-21.
- 47 Izcue A, Powrie F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology* 2008;123:6-10.
- 48 Yamamoto M, Rennert P, McGhee JR, et al. Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 2000;164:5184-91.
- 49 Bonaz B. The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2007;133:1370-3.
- 50 Cervený P, Bortlik M, Kubena A, et al. Nonadherence in inflammatory bowel disease: results of factor analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1244-9

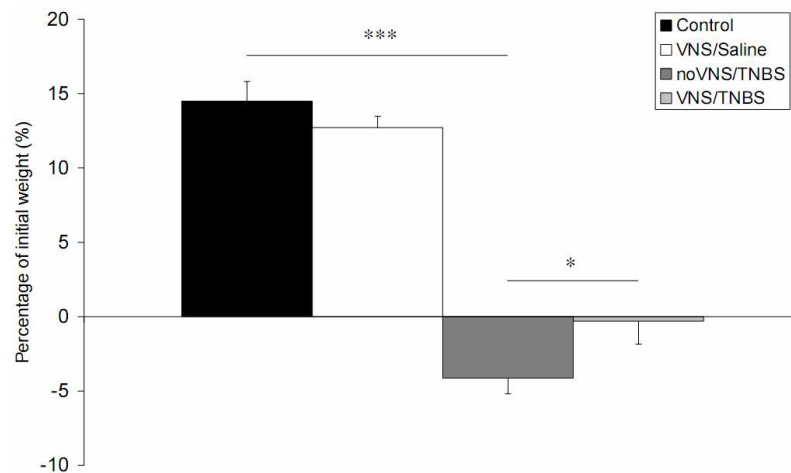
## Figure 1

*Effect of VNS on 24h body temperature evolution 12h after colonic instillation of saline or TNBS. An improvement was observed during the dark period in VNS/TNBS animals. Bar indicates the dark period. n ≥ 13; # P < 0.05, NoVNS/TNBS vs Control group.*



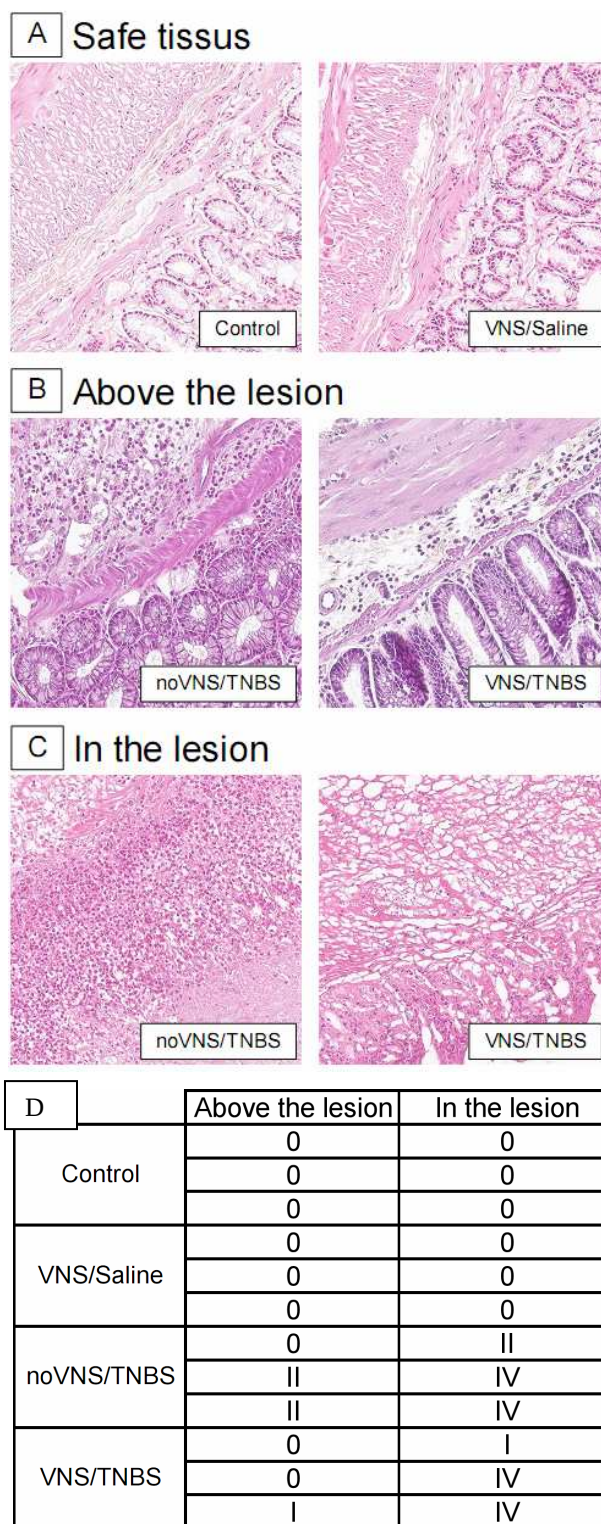
## Figure 2

*Effect of VNS on body weight change five days after colonic instillation of saline or TNBS. A significant decrease of body weight loss was observed in VNS/TNBS animals compared to noVNS/TNBS animals. n ≥ 12; \* P < 0.05; \*\*\* p < 0.001.*



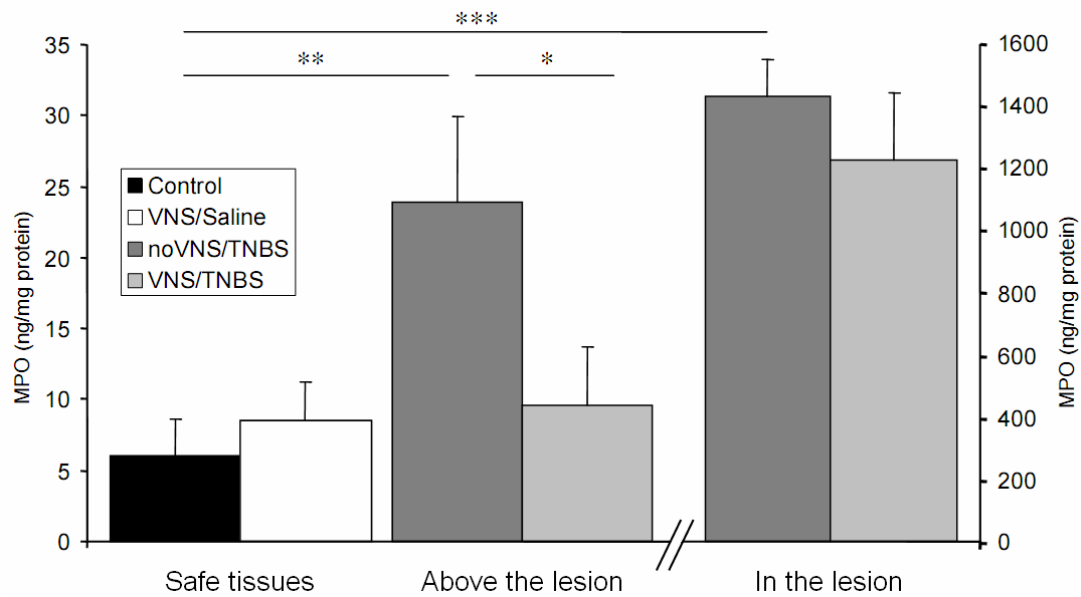
### Figure 3

*Effect of VNS on histological staining of representative colons five days after colonic instillation of saline or TNBS. Photograph of colonic samples, (A) in safe tissues, (B) above the lesion, (C) in the lesion. (D) Histological score from grade 0 to IV in these areas. A lower degree of inflammation was observed in the colon above the lesion in VNS/TNBS animals. n=3.*



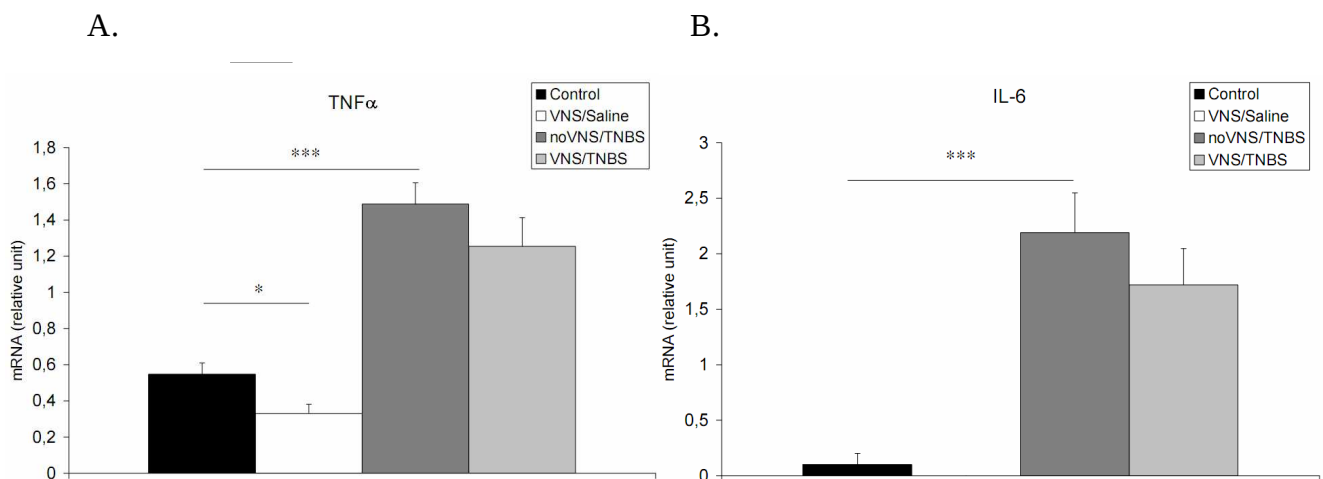
**Figure 4**

*Effect of VNS on MPO quantification in the colon.* VNS/TNBS animals presented a decrease of MPO concentration which was significant above the lesion.  $n \geq 7$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



**Figure 5**

*Effect of VNS on (A) TNF and (B) IL-6 mRNA levels in the lesion.* VNS induced a non significant decrease of these two mRNA levels.  $n \geq 12$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



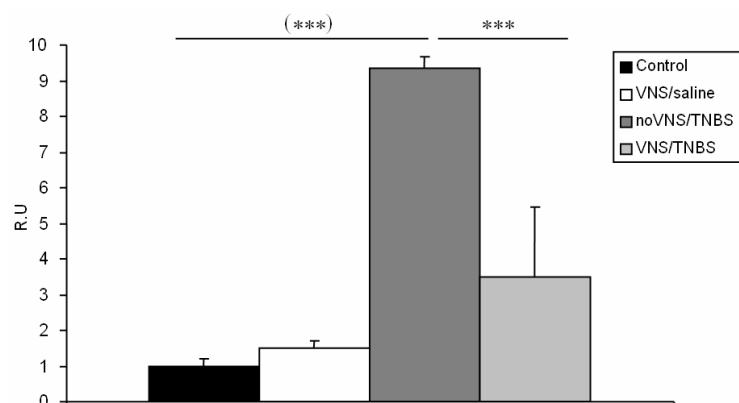
**Figure 6**

*Effect of VNS on the multivariate index of colitis.* (A) Parameters in descending order for contribution in the colitis model expressed by standardized coefficients and unstandardized coefficients used to calculate each rat score of inflammation (score =  $4.788 \times (1) - 5.233 \times (2) - 4.487 \times (3) \dots$ etc). (B) Multiparametric index obtained after discriminatory analysis applied on physiological parameters (locomotor activity, body temperature) and quantification level of cytokine and cytokine-related mRNAs (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, SOCS3, NF $\kappa$ BIA, TBX21) above and in the lesion (relative unit: RU) for the four groups. A significant decrease of the multivariate index of colitis was observed in VNS/TNBS animals compared to non stimulated rats.  $n \geq 12$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

A.

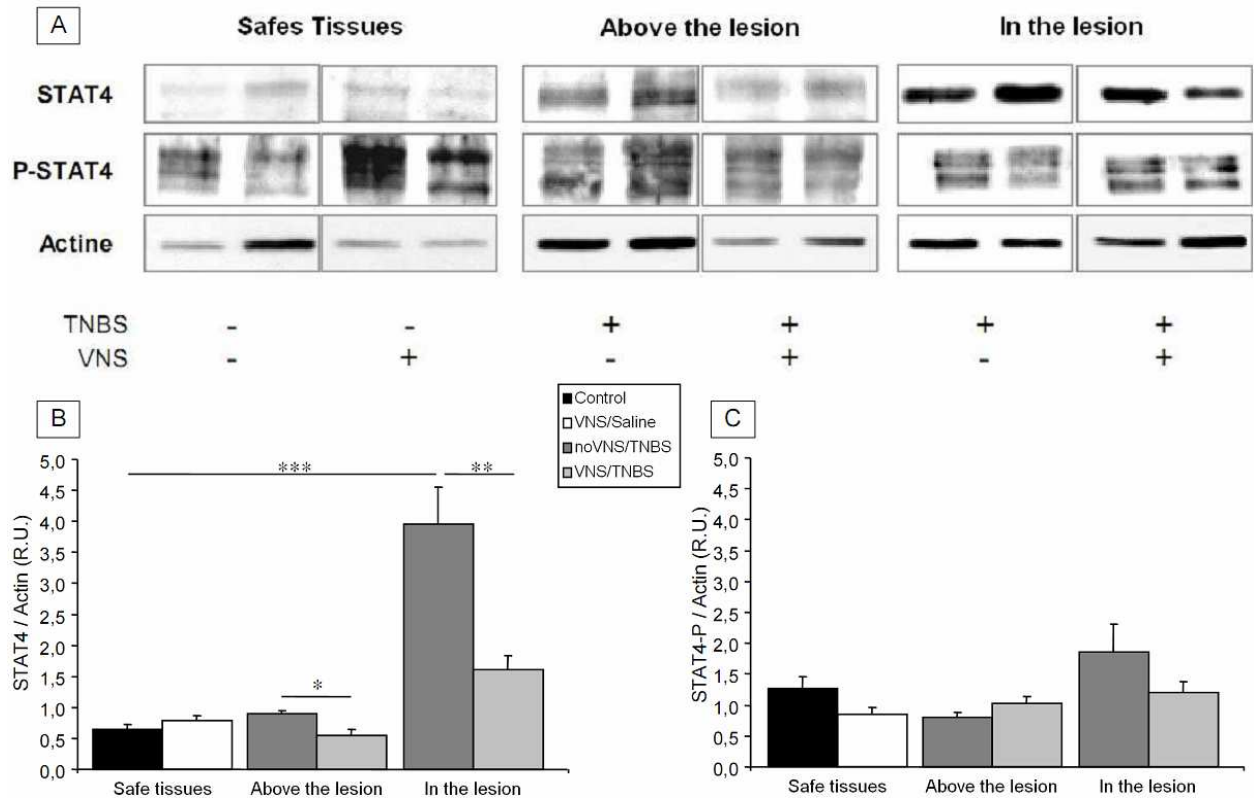
|    |                                  | standardized coefficients | unstandardized coefficients |
|----|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1  | IL-6 in the lesion               | 4.027                     | 4.788                       |
| 2  | SOCS3 in the lesion              | 3.622                     | -5.233                      |
| 3  | TNF $\alpha$ above the lesion    | 2.719                     | -4.487                      |
| 4  | IL-1 $\beta$ in the lesion       | 2.201                     | 2.692                       |
| 5  | NF $\kappa$ BIA in the lesion    | 2.091                     | -5.39                       |
| 6  | NF $\kappa$ BIA above the lesion | 1.82                      | 4.305                       |
| 7  | Body temperature at day 1        | 1.735                     | -3.95                       |
| 8  | Body temperature at day 2        | 1.726                     | 4.902                       |
| 9  | ICAM1 above the lesion           | 1.641                     | 4.352                       |
| 10 | ICAM1 in the lesion              | 1.068                     | 5.806                       |
| 11 | Mean of lesion areas             | 1.041                     | 1.139                       |
| 12 | IL-1 $\beta$ above the lesion    | 0.964                     | -1.963                      |
| 13 | SOCS3 above the lesion           | 0.959                     | 1.253                       |
| 14 | TNF $\alpha$ in the lesion       | 0.863                     | -2.901                      |
| 15 | TBX21 in the lesion              | 0.569                     | 2.516                       |
| 16 | Locomotion at day 2              | 0.432                     | -3.095                      |
| 17 | Locomotion at day 2              | 0.093                     | 0.703                       |

B.



**Figure 7**

*Effects of VNS on western blot analysis of STAT4 and P-STAT4. (A) Immunoblots of STAT4 and P-STAT4 (above and in the lesion for TNBS injected groups). (B) Graph shows STAT4/Actin report for the four groups in relative unit (RU). (C) Graph shows P-STAT4/Actin report for the four groups in RU. VNS significantly decreased the level of STAT4 proteins in TNBS animals either at the level of the lesion or above, this decrease being higher in the lesion. A non significant decrease of P-STAT4 was observed in VNS/TNBS animals. n ≥ 5; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.*



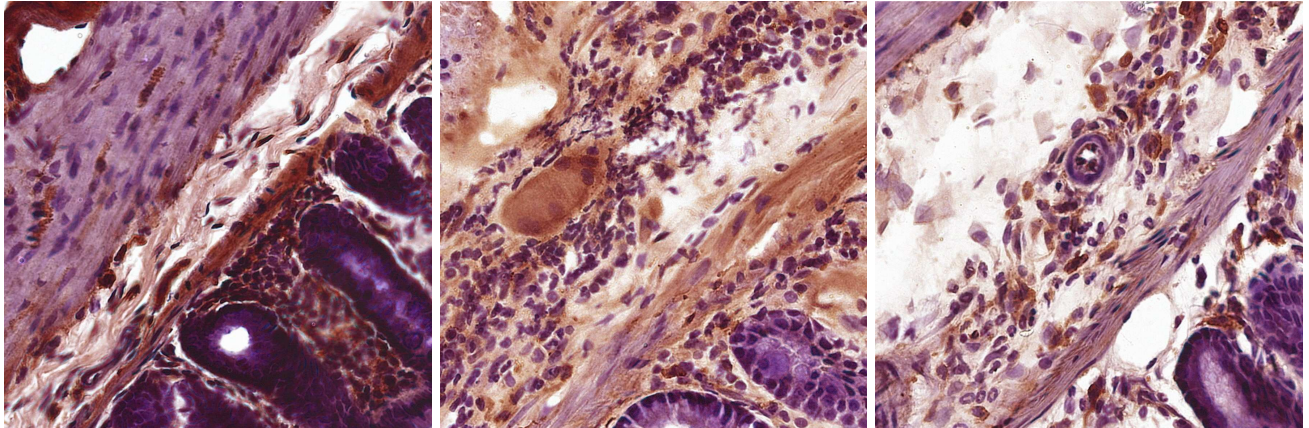
### Figure 8

*Immunohistochemical study of P-STAT4 above the lesion.* Photographs show P-STAT4-immunoreactive cells in colonic tissues of (A) control, (B) noVNS/TNBS, (C) VNS/TNBS groups. Original magnification: 40X. A decrease of P-STAT4 IR-cells was observed in the colon after VNS.

A.

B.

C.



# **Bibliographie**

# Bibliographie

- Ader J, Carré F, Dinh-Xuan AT, Duclos M, Kubis N, Mercier J, Mion F, Préfaut C & Roman S. (2006). *Physiologie*.
- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M & Li X. (2008). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*.
- Alexander WS & Hilton DJ. (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* **22**, 503-529.
- Altschuler SM, Escardo J, Lynn RB & Miselis RR. (1993). The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* **104**, 502-509.
- Andreaskos E, Taylor PC & Feldmann M. (2002). Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 615-620.
- Astrup J, Siesjo BK & Symon L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723-725.
- Bach SP & Mortensen NJ. (2007). Ileal pouch surgery for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* **13**, 3288-3300.
- Bailey P & Bremer FA. (1938). Sensory cortical representation of the vagus nerve. *J Neurophysiol* **1**, 405-412.
- Ballinger AB, Azooz O, El-Haj T, Poole S & Farthing MJ. (2000). Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis. *Gut* **46**, 694-700.
- Baron JC. (2001). Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* **11 Suppl 1**, 2-8.
- Benarroch EE. (1993). The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* **68**, 988-1001.
- Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ & Tracey KJ. (2002a). Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* **36**, 1231-1236.
- Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM & Tracey KJ. (2002b). Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* **195**, 781-788.
- Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D & Peuchmaur M. (2003).

Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* **52**, 840-846.

- Bluthe RM, Michaud B, Kelley KW & Dantzer R. (1996). Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport* **7**, 2823-2827.
- Bohotin C, Scholsem M, Multon S, Martin D, Bohotin V & Schoenen J. (2003). Vagus nerve stimulation in awake rats reduces formalin-induced nociceptive behaviour and fos-immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis. *Pain* **101**, 3-12.
- Boisse L, Van Sickle MD, Sharkey KA & Pittman QJ. (2003). Compromised neuroimmune status in rats with experimental colitis. *J Physiol* **548**, 929-939.
- Bonaz B. (2007). The cholinergic anti-inflammatory pathway and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **133**, 1370-1373.
- Bonaz B, Martin L, Beurriand E, Manier M, Hostein J & Feuerstein C. (1991). Modulation of the migrating myoelectric complex by brain noradrenergic systems in rats. *Am J Physiol* **260**, G340-345.
- Boon P, Raedt R, de Herdt V, Wyckhuys T & Vonck K. (2009). Electrical stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurotherapeutics* **6**, 218-227.
- Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M & Tracey KJ. (2000a). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci* **85**, 141-147.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW & Tracey KJ. (2000b). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**, 458-462.
- Bugajski AJ, Gil K, Ziomber A, Zurowski D, Zaraska W & Thor PJ. (2007). Effect of long-term vagal stimulation on food intake and body weight during diet induced obesity in rats. *J Physiol Pharmacol* **58 Suppl 1**, 5-12.
- Buijs RM, van der Vliet J, Garidou ML, Huitinga I & Escobar C. (2008). Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens. *PLoS One* **3**, e3152.
- Buller KM. (2001). Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 581-589.
- Cervený P, Bortlik M, Kubena A, Vlcek J, Lakatos PL & Lukas M. (2007). Nonadherence in inflammatory bowel disease: results of factor analysis. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 1244-1249.

- Chae JH, Nahas Z, Lomarev M, Denslow S, Lorberbaum JP, Bohning DE & George MS. (2003). A review of functional neuroimaging studies of vagus nerve stimulation (VNS). *J Psychiatr Res* **37**, 443-455.
- Chartier NT, Laine M, Gout S, Pawlak G, Marie CA, Matos P, Block MR & Jacquier-Sarlin MR. (2006). Laminin-5-integrin interaction signals through PI 3-kinase and Rac1b to promote assembly of adherens junctions in HT-29 cells. *J Cell Sci* **119**, 31-46.
- Chevrier C, Bourdon L & Canini F. (2006). Cosignaling of adenosine and adenosine triphosphate in hypobaric hypoxia-induced hypothermia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R595-600.
- Coccia EM, Remoli ME, Di Giacinto C, Del Zotto B, Giacomini E, Monteleone G & Boirivant M. (2005). Cholera toxin subunit B inhibits IL-12 and IFN- $\gamma$  production and signaling in experimental colitis and Crohn's disease. *Gut* **54**, 1558-1564.
- Code CF & Marlett JA. (1975). The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J Physiol* **246**, 289-309.
- Cunningham JT, Mifflin SW, Gould GG & Frazer A. (2008). Induction of c-Fos and DeltaFosB immunoreactivity in rat brain by Vagal nerve stimulation. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1884-1895.
- Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH & Stein JM. (2008). Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 23-33.
- Dantzer R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* **15**, 7-24.
- Dantzer R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol* **500**, 399-411.
- Dantzer R & Kelley KW. (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* **21**, 153-160.
- Dantzer R, Konsman JP, Bluth RM & Kelley KW. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* **85**, 60-65.
- Dantzer R & Wollman EE. (2003). [Relationships between the brain and the immune system]. *J Soc Biol* **197**, 81-88.
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM & Boeckxstaens GE. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* **6**, 844-851.

- Dedeurwaerdere S, Cornelissen B, Van Laere K, Vonck K, Achten E, Slegers G & Boon P. (2005). Small animal positron emission tomography during vagus nerve stimulation in rats: a pilot study. *Epilepsy Res* **67**, 133-141.
- Dennis C, Eddy F, Frykman M, McCarthy A & Westover D. (1946). The response to vagotomy in idiopathic ulcerative colitis and regional enteritis. *Ann Surg* **128**, 479-496.
- Diop L, Raymond F, Fargeau H, Petoux F, Chovet M & Doherty AM. (2002). Pregabalin (CI-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 1013-1022.
- Eaden JA, Abrams KR & Mayberry JF. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**, 526-535.
- Evans MS, Verma-Ahuja S, Naritoku DK & Espinosa JA. (2004). Intraoperative human vagus nerve compound action potentials. *Acta Neurol Scand* **110**, 232-238.
- Farahat K, Sobhani I, Bonnaud G, Vallot T, Vissuzaine C & Mignon M. (1999). *Rectocolite ulcérohémorragique : épidémiologie, physiopathologie, diagnostic, histoire naturelle et stratégie thérapeutique*. Paris.
- Farr G. (2002). *The autonomic nervous system*.
- Follesa P, Biggio F, Gorini G, Caria S, Talani G, Dazzi L, Puligheddu M, Marrosu F & Biggio G. (2007). Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res* **1179**, 28-34.
- Gaykema RP, Dijkstra I & Tilders FJ. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology* **136**, 4717-4720.
- Geboes K, Desreumaux P, Jouret A, Ectors N, Rutgeerts P & Colombel JF. (1999). [Histopathologic diagnosis of the activity of chronic inflammatory bowel disease. Evaluation of the effect of drug treatment. Use of histological scores]. *Gastroenterol Clin Biol* **23**, 1062-1073.
- Ghia JE, Blennerhassett P & Collins SM. (2007). Vagus nerve integrity and experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G560-567.
- Ghia JE, Blennerhassett P & Collins SM. (2008). Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *J Clin Invest* **118**, 2209-2218.
- Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, Verdu EF & Collins SM. (2006). The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* **131**, 1122-1130.

- Gotoh M, Iguchi A, Yatomi A, Uemura K, Miura H, Futenma A, Kato K & Sakamoto N. (1989). Vagally mediated insulin secretion by stimulation of brain cholinergic neurons with neostigmine in bilateral adrenalectomized rats. *Brain Res* **493**, 97-102.
- Greene E. (1963). *Anatomy of the rat*.
- Groves DA & Brown VJ. (2005). Vagal nerve stimulation: a review of its applications and potential mechanisms that mediate its clinical effects. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 493-500.
- Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS & Squadrito F. (2003). Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* **107**, 1189-1194.
- Gue M, Fioramonti J, Frexinos J, Alvinerie M & Bueno L. (1987). Influence of acoustic stress by noise on gastrointestinal motility in dogs. *Dig Dis Sci* **32**, 1411-1417.
- Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G & Fernandez-Luna JL. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **277**, 41701-41705.
- Hall KE, Greenberg GR, El-Sharkawy TY & Diamant NE. (1983). Vagal control of migrating motor complex-related peaks in canine plasma motilin, pancreatic polypeptide, and gastrin. *Can J Physiol Pharmacol* **61**, 1289-1298.
- Handforth A & Krael SE. (2001). Suppression of harmaline-induced tremor in rats by vagus nerve stimulation. *Mov Disord* **16**, 84-88.
- Henry TR, Bakay RA, Votaw JR, Pennell PB, Epstein CM, Faber TL, Grafton ST & Hoffman JM. (1998). Brain blood flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: I. Acute effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia* **39**, 983-990.
- Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ & Ulloa L. (2006). Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* **203**, 1623-1628.
- Kamina P. (2009). *Anatomie clinique*, vol. Tome 3 : Thorax Abdomen.
- Kapcala LP, He JR, Gao Y, Pieper JO & DeTolla LJ. (1996). Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1 beta stimulation of adrenocorticotropin secretion. *Brain Res* **728**, 247-254.
- Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y & Misawa H. (2007). Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* **80**, 2314-2319.

- Koutroubakis I, Manousos ON, Meuwissen SG & Pena AS. (1996). Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* **43**, 381-393.
- Krahl SE, Clark KB, Smith DC & Browning RA. (1998). Locus coeruleus lesions suppress the seizure-attenuating effects of vagus nerve stimulation. *Epilepsia* **39**, 709-714.
- Krahl SE, Senanayake SS, Pekary AE & Sattin A. (2004). Vagus nerve stimulation (VNS) is effective in a rat model of antidepressant action. *J Psychiatr Res* **38**, 237-240.
- Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G & Keshav S. (2003). Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* **125**, 47-57.
- Lane RD, Waldstein SR, Chesney MA, Jennings JR, Lovallo WR, Kozel PJ, Rose RM, Drossman DA, Schneiderman N, Thayer JF & Cameron OG. (2009). The rebirth of neuroscience in psychosomatic medicine, Part I: historical context, methods, and relevant basic science. *Psychosom Med* **71**, 117-134.
- Langley JN. (1921). *Autonomic nervous system, Part 1*. Cambridge.
- Lanska DJ. (2002). J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. *Neurology* **58**, 452-459.
- Laskiewicz J, Krolczyk G, Zurowski G, Sobocki J, Matyja A & Thor PJ. (2003). Effects of vagal neuromodulation and vagotomy on control of food intake and body weight in rats. *J Physiol Pharmacol* **54**, 603-610.
- Laye S, Bluthé RM, Kent S, Combe C, Medina C, Parnet P, Kelley K & Dantzer R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol* **268**, R1327-1331.
- Lefebvre PJ, Luyckx AS & Brassinne AH. (1978). Vagal stimulation and its role in eliciting gastrin but not glucagon release from the isolated perfused dog stomach. *Gut* **19**, 185-188.
- Levey AI. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13541-13546.
- Liu WC, Mosier K, Kalnin AJ & Marks D. (2003). BOLD fMRI activation induced by vagus nerve stimulation in seizure patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**, 811-813.
- Louvet B, Buisine MP, Desreumaux P, Tremaine WJ, Aubert JP, Porchet N, Capron M, Cortot A, Colombel JF & Sandborn WJ. (1999). Transdermal nicotine decreases mucosal IL-8 expression but has no effect on mucin gene expression in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 174-181.
- Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A & Odum N. (2003). Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 16777-16781.

- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW & Wonnacott S. (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **51**, 397-401.
- Marieb E. (2005). *Anatomie et physiologie humaines*.
- Mazelin L, Theodorou V, Fioramonti J & Bueno L. (1999). Vagally dependent protective action of calcitonin gene-related peptide on colitis. *Peptides* **20**, 1367-1374.
- McCafferty DM, Wallace JL & Sharkey KA. (1997). Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat. *Am J Physiol* **272**, G272-280.
- McHugh KJ, Collins SM & Weingarten HP. (1994). Central interleukin-1 receptors contribute to suppression of feeding after acute colitis in the rat. *Am J Physiol* **266**, R1659-1663.
- Merle A, Faucheron JL, Delagrè P, Renard P, Roche M & Pellissier S. (2000). Nycthemeral variations of cholecystokinin action on intestinal motility in rats: effects of melatonin and S 20928, a melatonin receptor antagonist. *Neuropeptides* **34**, 385-391.
- Miceli PC & Jacobson K. (2003). Cholinergic pathways modulate experimental dinitrobenzene sulfonic acid colitis in rats. *Auton Neurosci* **105**, 16-24.
- Moore K & Dalley A. (2001). *Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques*
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR & Wallace JL. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**, 795-803.
- Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J & Neurath MF. (2005). Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* **100**, 64-72.
- Naritoku DK, Terry WJ & Helfert RH. (1995). Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res* **22**, 53-62.
- Netter F. (2007). *Atlas d'anatomie humaine*.
- NguyenHuu, Person H, B. V & (1999). *Nouveau dossier d'anatomie PCEM*, vol. Tête - Tome 1, Nouvelle nomenclature.
- O'Malley JT, Eri RD, Stritesky GL, Mathur AN, Chang HC, Hogenesch H, Srinivasan M & Kaplan MH. (2008). STAT4 isoforms differentially regulate Th1 cytokine production and the severity of inflammatory bowel disease. *J Immunol* **181**, 5062-5070.

- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y & Nakaya R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702.
- Oke SL & Tracey KJ. (2008). From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. *J Leukoc Biol* **83**, 512-517.
- Osharina V, Bagaev V, Wallois F & Larnicol N. (2006). Autonomic response and Fos expression in the NTS following intermittent vagal stimulation: importance of pulse frequency. *Auton Neurosci* **126-127**, 72-80.
- Pang YH, Zheng CQ, Yang XZ & Zhang WJ. (2007). Increased expression and activation of IL-12-induced Stat4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients. *Cell Immunol* **248**, 115-120.
- Pardo JV, Sheikh SA, Kuskowski MA, Surerus-Johnson C, Hagen MC, Lee JT, Rittberg BR & Adson DE. (2007). Weight loss during chronic, cervical vagus nerve stimulation in depressed patients with obesity: an observation. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1756-1759.
- Pardo JV, Sheikh SA, Schwindt GC, Lee JT, Kuskowski MA, Surerus C, Lewis SM, Abuzzahab FS, Adson DE & Rittberg BR. (2008). Chronic vagus nerve stimulation for treatment-resistant depression decreases resting ventromedial prefrontal glucose metabolism. *Neuroimage* **42**, 879-889.
- Pauleau AL & Murray PJ. (2003). Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* **23**, 7531-7539.
- Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y & Tracey KJ. (2006). Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5219-5223.
- Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, Levi J, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Larosa GJ, Miller EJ, Tracey KJ & Al-Abed Y. (2007). Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* **35**, 1139-1144.
- Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K, Chavan S, Al-Abed Y & Tracey KJ. (2009). Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* **23**, 41-45.
- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG & Tracey KJ. (2003). The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* **9**, 125-134.
- Paxinos G & Watson C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y & Multon E. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* **5**, 3.

- Pellissier S, Eribon O, Chabert J, Gully D & Roche M. (1996). Peripheral neurotensin participates in the modulation of pre- and postprandial intestinal motility in rats. *Neuropeptides* **30**, 412-419.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Porcher C, Juhem A, Peinnequin A, Sinniger V & Bonaz B. (2005). Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G1091-1103.
- Porcher C, Sinniger V, Juhem A, Mouchet P & Bonaz B. (2004). Neuronal activity and CRF receptor gene transcription in the brains of rats with colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G803-814.
- Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kuhbacher T, Ghosh S, Arnott ID & Forbes A. (2003). Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* **52**, 998-1002.
- Randall WC & Ardell JL. (1985). Selective parasympathectomy of automatic and conductile tissues of the canine heart. *Am J Physiol* **248**, H61-68.
- Ribet R. (1952). *Anatomies schématique de l'appareil nerveux - Les nerfs crâniens*.
- Rigaud D, Angel LA, Cerf M, Carduner MJ, Melchior JC, Sautier C, Rene E, Apfelbaum M & Mignon M. (1994). Mechanisms of decreased food intake during weight loss in adult Crohn's disease patients without obvious malabsorption. *Am J Clin Nutr* **60**, 775-781.
- Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J & Laflamme N. (2000). How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**, 22-38.
- Roitt I, J. B & D. M. (2002). *Immunologie*.
- Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S & Tracey KJ. (2008). Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11008-11013.
- Ruckebusch Y & Laplace JP. (1967). [Intestinal motility in sheep: mechanical and electrical phenomena]. *C R Seances Soc Biol Fil* **161**, 2517-2523.
- Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y & Metz CN. (2005). Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* **201**, 1113-1123.
- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A & Yamamoto-Furusho JK. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 4280-4288.

- Sawchenko PE & Swanson LW. (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* **257**, 275-325.
- Schlaepfer TE, Frick C, Zobel A, Maier W, Heuser I, Bajbouj M, O'Keane V, Corcoran C, Adolfsson R, Trimble M, Rau H, Hoff HJ, Padberg F, Muller-Siecheneder F, Audenaert K, Van den Abbeele D, Stanga Z & Hasdemir M. (2008). Vagus nerve stimulation for depression: efficacy and safety in a European study. *Psychol Med* **38**, 651-661.
- Schmittgen TD & Livak KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- Schultzberg M, Hokfelt T, Nilsson G, Terenius L, Rehfeld JF, Brown M, Elde R, Goldstein M & Said S. (1980). Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase. *Neuroscience* **5**, 689-744.
- Sharma P, Makharia GK, Ahuja V, Dwivedi SN & Deepak KK. (2009). Autonomic dysfunctions in patients with inflammatory bowel disease in clinical remission. *Dig Dis Sci* **54**, 853-861.
- Silk DB & Payne-James J. (1989). Inflammatory bowel disease: nutritional implications and treatment. *Proc Nutr Soc* **48**, 355-361.
- Sinniger V, Mouchet P & Bonaz B. (2005). Effect of nor-trimebutine on neuronal activation induced by a noxious stimulus or an acute colonic inflammation in the rat. *Life Sci* **77**, 2927-2941.
- Sinniger V, Porcher C, Mouchet P, Juhem A & Bonaz B. (2004). c-fos and CRF receptor gene transcription in the brain of acetic acid-induced somato-visceral pain in rats. *Pain* **110**, 738-750.
- Sjogren MJ, Hellstrom PT, Jonsson MA, Runnerstam M, Silander HC & Ben-Menachem E. (2002). Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: a pilot study. *J Clin Psychiatry* **63**, 972-980.
- Sobocki J, Krolczyk G, Herman RM, Matyja A & Thor PJ. (2005). Influence of vagal nerve stimulation on food intake and body weight--results of experimental studies. *J Physiol Pharmacol* **56 Suppl 6**, 27-33.
- Sternberg EM. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* **6**, 318-328.
- Strober W, Fuss IJ & Blumberg RS. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **20**, 495-549.
- Sucholeiki R, Alsaadi TM, Morris GL, 3rd, Ulmer JL, Biswal B & Mueller WM. (2002). fMRI in patients implanted with a vagal nerve stimulator. *Seizure* **11**, 157-162.

- Tateishi H, Mitsuyama K, Toyonaga A, Tomoyose M & Tanikawa K. (1997). Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion* **58**, 271-281.
- The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, Cash JL, Bennink R, Larosa GJ, van den Wijngaard RM, Greaves DR & de Jonge WJ. (2007). Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* **133**, 1219-1228.
- Thoreck P. (1951). Vagotomy for idiopathic ulcerative colitis and regional enteritis *JAMA* **145**, 140-146.
- Tracey KJ. (2002). The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853-859.
- Tracey KJ. (2007). Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* **117**, 289-296.
- Ulloa L. (2005). The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 673-684.
- Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE & de Jonge WJ. (2009a). The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 6-17.
- van der Zanden EP, Snoek SA, Heinsbroek SE, Stanisor OI, Verseijden C, Boeckxstaens GE, Peppelenbosch MP, Greaves DR, Gordon S & De Jonge WJ. (2009b). Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4\beta 2$ . *Gastroenterology* **137**, 1029-1039, 1039 e1021-1024.
- Van Laere K, Vonck K, Boon P, Versijpt J & Dierckx R. (2002). Perfusion SPECT changes after acute and chronic vagus nerve stimulation in relation to prestimulus condition and long-term clinical efficacy. *J Nucl Med* **43**, 733-744.
- Van Limbergen J, Wilson DC & Satsangi J. (2009). The Genetics of Crohn's Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*
- van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, Tracey KJ & van der Poll T. (2006). The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology* **130**, 1822-1830.
- van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ & van der Poll T. (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* **191**, 2138-2148.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.
- Vodovotz Y, Constantine G, Rubin J, Csete M, Voit EO & An G. (2009). Mechanistic simulations of inflammation: current state and future prospects. *Math Biosci* **217**, 1-10.

- Vodovotz Y, Csete M, Bartels J, Chang S & An G. (2008). Translational systems biology of inflammation. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000014.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ & Tracey KJ. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**, 384-388.
- Wessler I & Kirkpatrick CJ. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* **154**, 1558-1571.
- Wurster AL, Tanaka T & Grusby MJ. (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* **19**, 2577-2584.
- Yazdanyar S & Nordestgaard BG. (2009). NOD2/CARD15 genotype and common gastrointestinal diseases in 43 600 individuals. *J Intern Med*.
- Young HM. (2005). Neural stem cell therapy and gastrointestinal biology. *Gastroenterology* **129**, 2092-2095.
- Zagon A & Kemeny AA. (2000). Slow hyperpolarization in cortical neurons: a possible mechanism behind vagus nerve simulation therapy for refractory epilepsy? *Epilepsia* **41**, 1382-1389.